

ELISANDRA GRANGEIRO DE CARVALHO

“INVESTIGAÇÃO DA LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL) EM
PACIENTES COM DOENÇA CELÍACA”

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Iara Taborda de Messias Reason

Co-orientadora: Prof. Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama

CURITIBA
2006

*AOS MEUS PAIS, meu porto seguro, pelos
primeiros passos na vida, pela confiança,
incentivo e amor incondicionais...*

AO MEU IRMÃO, pelo apoio e compreensão...

Com imenso amor...

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Iara José Taborda de Messias Reason, pelo material para a realização desse trabalho e pela sabedoria na orientação e correção do mesmo. Agradeço também as palavras abençoadas divididas comigo que fortaleceram e reavivaram minha fé, e pelo exemplo de ser humano no qual hoje me espelho;

À professora Dra. Shirley Ramos da Rosa Utiyama, pelo perfeccionismo, dedicação e serenidade na orientação e correção dessa dissertação os quais certamente me deram segurança para continuar. Agradeço imensamente a amizade e carinho que venho recebendo desde a graduação, presentes tão preciosos que guardarei por toda vida. Toda a minha admiração;

À Dra. Lorete M. Kotze, pela seleção e dados dos pacientes estudados, além da contribuição tão valiosa expressa no tempo dedicado a essa dissertação, correções e sugestões. Meu sincero respeito;

Ao Dr. Ederaldo Telles de Queiroz e Dr. Sérgio Yoshii pela contribuição como patologistas;

A Dra. Elvira e funcionários do laboratório de sorologia do HC pela permissão e auxílio na utilização do nefelômetro;

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Prof. Cid Aimbiré dos Santos, Prof. Almeriane dos Santos e à Regina Montrezol, secretária do programa;

Ao Farmacêutico Bioquímico Renato Nisihara, pela contribuição e sugestões em cada etapa desse trabalho e principalmente pelo estímulo e amizade desde a iniciação científica;

Ao Farmacêutico Bioquímico Valmir Mocelim e aos técnicos Ery e Luiz, funcionários do Laboratório de Imunopatologia, pelo apoio constante;

A Dra. Lílian Pereira, pela contribuição, incentivo e conhecimento compartilhado;

Ao colega de mestrado Altair Rogério Ambrosio pelos momentos compartilhados e em especial à Luciana Dornelles, pela amizade e companheirismo tão importantes nessa caminhada. Agradeço também a aluna de iniciação científica Flávia, e ao de mestrado, João, pelo apoio e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 SISTEMA COMPLEMENTO.....	4
3.1.1 Aspectos gerais.....	4
3.1.2 Ativação do Sistema Complemento.....	6
3.1.2.1 Via clássica.....	6
3.1.2.2 Via alternativa.....	8
3.1.2.3 Via das lectinas.....	9
3.1.2.4 O complexo de ataque à membrana.....	10
3.1.3 Mecanismos de Regulação da cascata do complemento.....	11
3.1.4 Conseqüências biológicas da ativação do complemento.....	11
3.1.5 O sistema complemento na doença.....	14
3.2 A LECTINA LIGANTE DE MANOSE.....	15
3.2.1 Estrutura.....	15
3.2.2 Genética e concentração sérica.....	17
3.2.3 Funções.....	18
3.2.4 A lectina ligante de manose nas doenças.....	19
3.3 A PROTEÍNA C-REATIVA.....	21
3.4 A DOENÇA CELÍACA.....	22
3.4.1 Aspectos gerais.....	22

3.4.2 Influências ambientais na doença celíaca.....	23
3.4.3 Classificação e apresentação clínica.....	24
3.4.4 Diagnóstico.....	26
3.4.5 Aspectos genéticos da doença celíaca.....	28
3.4.6 Auto-imunidade e doença celíaca.....	29
3.4.7 Imunopatogenia da doença celíaca.....	30
3.4.8 O complemento na doença celíaca.....	32
3.4.9 A lectina ligante de manose e a doença celíaca.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 CASUÍSTICA.....	35
4.1.1 Pacientes.....	35
4.1.2 Grupo controle.....	35
4.2 METODOLOGIA.....	36
4.2.1 Coleta de sangue.....	36
4.2.2 Quantificação da MBL sérica.....	36
4.2.3 Quantificação da proteína C-reativa (PCR-as).....	38
4.2.4 Pesquisa de anticorpos antiendomísio (EmA-IgA).....	39
4.2.5 Pesquisa de auto-anticorpos.....	39
4.2.6 Avaliação histológica.....	39
4.2.7 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS.....	41
5.1 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL: COMPARAÇÃO ENTRE PACIENTES E CONTROLES.....	41
5.2 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO AO SEXO.....	41
5.3 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO À INGESTÃO DE GLÚTEN.....	44
5.4 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO AO TÍTULO DO ANTICORPO ANTIENDOMÍSIO.....	44
5.5 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO AO GRAU DE LESÃO DAS BIÓPSIAS INTESTINAIS.....	45
5.6 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO A OUTRAS DOENÇAS AUTO-IMUNES CONCOMITANTES.....	46
5.7 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE OUTROS AUTO-ANTICORPOS.....	47

5.8 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO À OCORRÊNCIA DE ABORTO ESPONTÂNEO.....	48
5.9 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES DO SEXO MASCULINO E FEMININO COM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS LABORATORIAIS E CLÍNICOS.....	48
5.10 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PCR EM PACIENTES COM DC.....	49
5.11 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PCR EM PACIENTES EM RELAÇÃO À INGESTÃO DE GLÚTEN.....	50
5.12 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PCR EM PACIENTES EM RELAÇÃO A DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS.....	51
5.13 CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL X E DA PCR EM PACIENTES.....	52
6 DISCUSSÃO.....	53
6.1 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL EM PACIENTES COM DC E POPULAÇÃO SADIA.....	54
6.2 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL E GRAVIDADE DA DC.....	56
6.3 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS DE AUTO-IMUNIDADE E DE ABORTOS ESPONTÂNEOS.....	59
6.4 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCR E CORRELAÇÃO COM A MBL SÉRICA.....	63
7 CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
APÊNDICES.....	81
ANEXOS.....	93

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PROTEÍNAS REGULATÓRIAS DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO.....	12
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	7
FIGURA 2 - ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA MBL.....	16
FIGURA 3 -RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DOENÇA CELÍACA.....	31
FIGURA 4 -REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE ELISA PARA A MBL.....	38

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES E CONTROLES.....	42
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS.....	43
TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES EM RELAÇÃO À INGESTÃO DE GLÚTEN.....	44
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM RELAÇÃO AO TÍTULO DO ANTICORPO ANTIENDOMÍSIO.....	45
TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES COM BIÓPSIAS GRAU II E GRAUS III/IV.....	46

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES COM E SEM OUTRAS DOENÇAS AUTO- IMUNES.....	47
TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES COM E SEM OUTROS AUTO-ANTICORPOS.....	48
TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES COM OCORRÊNCIA OU NÃO DE ABORTOS.....	49
TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCR EM PACIENTES EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS.....	50
TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCR EM PACIENTES EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE GLÚTEN NA DIETA.....	50
TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCR EM PACIENTES EM RELAÇÃO A DADOS CLÍNICOS E SOROLÓGICOS.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL EM PACIENTES COM DC E CONTROLES.....	42
GRÁFICO 2 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL EM RELAÇÃO AO SEXO DOS PACIENTES.....	43
GRÁFICO 3 – CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL E DE PCR DOS PACIENTES.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAM	Anticorpo antimicrosomal tireoideano
AGA-IgA	Anticorpo anti-gliadina da classe IgA
AGA-IgG	Anticorpo anti-gliadina da classe IgG
AML	Anticorpo antimúsculo liso
AMA	Anticorpo antimitocôndria
ANA	Anticorpo antinuclear
BF	Fator B
CGP	Anticorpo anticélula gástrica parietal
CH3	Domínio 3 da região Fc do complemento
CRD	<i>Carbohydrate recognition domain</i> - Domínio de reconhecimento de carboidrato
CR1	Receptor do complemento tipo 1
CR2	Receptor do complemento tipo 2
CR3	Receptor do complemento tipo 3
CR4	Receptor do complemento tipo 4
CR5	Receptor do complemento tipo 5
C1 INH	Inibidor de C1
C3aR	Receptor celular do fragmento C3a
C4aR	Receptor celular do fragmento C4a
C5aR	Receptor celular do fragmento C5a
C5b-9	Complexo lítico de membrana de C5b à C9
DAF	Fator de decaimento da aceleração
DC	Doença Celíaca
DAI	Doenças auto-imunes
ELISA	Enzima imunoensaio
EmA-IgA	Anticorpo antiendomísio da classe IgA
EmA-IgG	Anticorpo antiendomísio da classe IgG
Fc	Fragmento cristalizável da imunoglobulina
HLA	Antígeno leucocitário humano
ICA	Anticorpo anticélulas das ilhotas
Ig	Imunoglobulinas
IL-1	Interleucina 1

IL-6	Interleucina 6
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LIE	Linfócitos intra-epiteliais
LKM	Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim
MAC	Complexo de ataque à membrana
MASP	<i>MBL-associated serine protease</i> – serina protease associada à MBL
MBL	<i>Mannan-binding lectin</i> - Lectina ligante de manose
PCR-as	Proteína C-reativa de alta sensibilidade
Phc	Fosfatidilcolina
TCR	Receptor de célula T
tTG	Transglutaminase tecidual
tTG-IgA	Anticorpo antitransglutaminase da classe IgA
TNF-á	Fator de necrose tumoral á
VCAM-1	Molécula de adesão -1

RESUMO

A lectina ligante de manose (MBL) se constitui na proteína central de ativação da via das lectinas do sistema complemento. Sua concentração sérica é geneticamente determinada, variando significativamente entre indivíduos e está associada a condições como suscetibilidade a infecções, abortos espontâneos, doenças auto-imunes e inflamatórias. A MBL é considerada uma proteína de fase aguda, embora apresente aumentos modestos em relação à proteína C reativa (PCR). A doença celíaca (DC) consiste em uma enteropatia autoimune decorrente da resposta anormal ao glúten e proteínas relacionadas, em indivíduos geneticamente susceptíveis. Estudos recentes evidenciam a participação da MBL na patogênese da DC. Neste estudo determinou-se a concentração sérica de MBL e de PCR em pacientes com DC, visando associar com a presença de glúten na dieta, gravidade da doença, ocorrência de abortos e de outras doenças autoimunes. Foram estudados 101 pacientes (27 , 74 , 2-77 anos) e 120 indivíduos sadios (33 , 87 , 1-78 anos). A determinação de MBL foi realizada por imunoensaio enzimático (ELISA), e para PCR utilizou-se metodologia ultra-sensível, por nefelometria. A associação com a gravidade da doença foi avaliada através das alterações histológicas da mucosa intestinal. Os anticorpos anti-endomísio (EmA-IgA) e demais auto-anticorpos foram pesquisados por imunofluorescência indireta (IFI). Os resultados obtidos não mostraram diferença significativa na concentração sérica de MBL entre pacientes e controles, embora um aumento significativo na mediana da concentração da MBL tenha sido observado nos pacientes do sexo masculino em relação ao feminino ($p=0,0245$). Pacientes em uso de glúten na dieta não apresentaram concentração sérica da proteína significativamente diferente daqueles em dieta isenta de glúten. Os títulos do EmA-IgA e o grau de lesão da mucosa intestinal não mostraram relação com a concentração sérica da MBL (1:5 vs 1:10; $p=0,046$ e grau II vs grau III/IV; $p=0,412$, respectivamente). Entre os pacientes com outras doenças autoimunes concomitantes à DC (26.7%) e com presença de outros auto-anticorpos (12.87%), observou-se concentrações séricas de MBL diminuídas (971,28 ng/ml e 728,46 ng/ml, respectivamente) em relação aqueles sem tais características (1769,89 ng/ml e 1713,74 ng/ml), entretanto esses resultados não foram estatisticamente significantes. A ocorrência de abortos espontâneos foi detectada em 36.36% das pacientes com DC, porém não se evidenciou uma relação causa-efeito com os valores de MBL. A concentração sérica da PCR foi superior a 0,5mg/dl em 20,5% dos pacientes com DC. Não houve diferença significativa quando a concentração de PCR-as foi avaliada em relação ao sexo dos pacientes, presença de glúten na dieta e demais parâmetros clínicos e sorológicos. Os valores de MBL e PCR não se correlacionaram entre si ($r=0,01015$). Os dados obtidos no presente estudo sugerem não haver relação de causa-efeito entre a concentração sérica da MBL e os aspectos da DC analisados para a população de pacientes em estudo.

ABSTRACT

Mannan-binding lectin (MBL) is the central protein in the activation of the lectin pathway of complement system. MBL plasma concentration is genetically determined. It varies significantly among individuals and was shown to be associated with conditions such as susceptibility to infections, spontaneous abortion, autoimmune and inflammatory diseases. MBL is considered an acute phase protein although only exhibits modest increase in serum levels when compared to C-reactive protein (CRP). Celiac Disease (CD) is an autoimmune enteropathy resulting from abnormal immune response to dietary gluten and related proteins, occurring in genetically susceptible individuals. Recent findings showed that MBL is associated with the pathogenesis of CD. In this study, MBL and CRP serum levels were determined in celiac patients, with the aim to associate with the presence of gluten in the diet, disease severity, spontaneous abortion and the presence of concomitant autoimmune diseases. A hundred and one patients (27 , 74 , 2-77 years) and 120 healthy controls (33 , 87 , 1-78 years) were investigated. MBL concentration was determined by ELISA while CRP concentration was determined by nephelometry, using high sensitivity method. The association with the disease severity was evaluated by histological findings of intestinal mucosa. The EmA-IgA and other auto antibodies were tested by indirect immunofluorescence. No significant differences were observed in the MBL serum levels between patients and controls although a significant increase was observed in male patients when compared to female ($p=0,0245$). Patients ingesting gluten showed no difference in MBL serum levels from those in a gluten free diet. EmA-IgA titers and histological changes presented no relation to MBL levels ($1:5$ vs $1:10$; $p=0.378$). Patients with other concomitant autoimmune diseases (26,70%) and with other auto antibodies (12,87%) showed a non significant decrease in MBL levels (971,28 ng/ml and 728,46 ng/ml, respectively) in relation to patients without these features (1769,89 ng/ml e 1713,74 ng/ml). The occurrence of spontaneous abortion was detected in 36,36% of the patients, but there was no causal relation with MBL concentration. The CRP-hs serum levels were higher than 0,5mg/dl in 20,5% of the celiac patients. No association was detected when CRP-hs serum levels were analyzed in relation to gender, presence of gluten in the diet and other clinical and serological features. No correlation was found between MBL and PCR-hs serum levels ($r=0,01015$). These findings suggest that circulating MBL concentration is not associated with the aspects of CD analyzed, in this group of patients.

1 INTRODUÇÃO

O sistema complemento é formado por, aproximadamente, 35 proteínas plasmáticas e associadas à membrana celular, constituindo uma das principais vias efetoras da resposta imunológica e inflamatória. Estas proteínas, quando ativadas, desempenham importante papel na manutenção da homeostase do hospedeiro, através do combate a microorganismos e da remoção de complexos imunes circulantes e de células apoptóticas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

A lectina ligante de manose (MBL) é o componente central da ativação da via das lectinas do sistema complemento. É sintetizada no fígado e pertence à família das colectinas, proteínas cujos domínios lectina aparecem associados a estruturas colagenosas (PRODINGER, 2003).

A MBL humana é composta por polímeros de até 6 subunidades, sendo que cada monômero é formado por 3 cadeias polipeptídicas idênticas que apresentam os domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD), através dos quais a MBL se liga aos diferentes patógenos ou superfícies celulares. Para a completa atividade funcional da MBL, é necessário que esteja no mínimo na forma de tetrâmero e que os três domínios de ligação de lectina obedeçam a distâncias constantes de separação entre si (TURNER, 2003).

A MBL liga-se a açúcares como manose, fucose, glicose e N-acetil-D-glucosamina na superfície de vírus, bactérias, leveduras, fungos e superfícies celulares diversas, levando a ativação do complemento. Pode ainda, interagir diretamente com receptores de colectinas nas células fagocíticas, promovendo a opsonização e fagocitose em processos imunes (TURNER, 1996).

Sabe-se também que a MBL exerce influência na modulação da inflamação, estimulando a liberação de citocinas por monócitos de maneira dose-dependente. Ao ligar-se a células apoptóticas, atua sinalizando o início da fagocitose. Fortes evidências mostram que a deficiência da MBL está associada à maior suscetibilidade a doenças infecciosas e auto-imunes, podendo influenciar na sua gravidade e curso clínico (DAVIES et al., 1997; JACK et al., 2001; OGDEN, et al, 2001; EISEN; MICNCHINTON, 2003). A associação dessa com abortos espontâneos foi demonstrada em população sadia da Escócia e Dinamarca (CHRISTIANSEN et al.,1999).

Considera-se que a MBL seja uma proteína de fase aguda, embora o seu aumento seja modesto quando comparado com o da proteína C-reativa (PCR). Essa última é considerada como parte integrante da resposta inata do sistema imune e é liberada rapidamente e poucas horas após o estímulo e promove defesa contra patógenos, eliminação de células necróticas e apoptóticas, entre outras funções, exercendo importante papel na defesa do hospedeiro (THIEL et al., 1992; DU CLOS, 2000).

A doença celíaca (DC) consiste em uma enteropatia por sensibilidade ao glúten presente em cereais como trigo, centeio, cevada e aveia. Resulta de uma complexa interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Em sua forma clássica apresenta sintomas e sinais de má absorção intestinal, encurtamento de vilosidades, hiperplasia de criptas e aumento do número dos linfócitos intra-epiteliais. Componentes humorais e celulares da resposta imune participam ativamente no processo de lesão da mucosa intestinal na DC. Inúmeros estudos têm demonstrado que a ativação do sistema complemento representa importante papel na patogênese da doença com envolvimento das vias clássica e alternativa. Além dessas, alguns estudos recentes sugerem o envolvimento da via das lectinas na patogênese da doença (BONIOTTO et al., 2005; HAMER, 2005)

Embora o envolvimento da MBL tenha sido demonstrado em algumas doenças como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, púrpura de Henoch Schonlein e nefropatia por IgA, os relatos em DC são escassos e restritos aos aspectos genéticos em pacientes da Itália e Finlândia. (ILTANEN et al., 2003; BONIOTTO et al., 2005). Especificamente, na população brasileira, ainda não foi realizado nenhum estudo de associação entre a MBL e DC. O presente estudo visa investigar a participação da via das lectinas na DC e seu possível envolvimento com aspectos clínicos, sorológicos e histológicos relacionados à doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a concentração plasmática da lectina ligante de manose em pacientes com doença celíaca (DC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Comparar a concentração da MBL no soro de pacientes com DC e grupo controle;
- b) Correlacionar os achados com aspectos sorológicos e histológicos da doença, bem como com associações e complicações da DC;
- c) Determinar a concentração sérica da proteína C-reativa (PCR-as) em pacientes com DC e correlacionar com os valores de MBL.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SISTEMA COMPLEMENTO

3.1.1 Aspectos gerais

Complemento representa um termo coletivo usado para designar um grupo de proteínas que desempenham papel chave no processo de defesa do hospedeiro (FRANK, 1997). Esse compreende um conjunto de mais de 30 proteínas séricas e de superfície celular que interagem com outras moléculas do sistema imune de maneira altamente regulada, como um importante mecanismo efetor da imunidade humoral e inata (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; JANEWAY, 2002).

Várias células do organismo são capazes de promover a síntese das proteínas do complemento, entretanto, as mais importantes são os hepatócitos, macrófagos presentes nos tecidos, células endoteliais e células mesangiais renais. Dentre essas, somente os hepatócitos e os monócitos são capazes de produzir todos os componentes do sistema complemento (ANTUNES, 1992).

A ativação do complemento se dá por três vias principais denominadas clássica, alternativa e a via das lectinas. A via clássica faz parte da resposta imune específica do hospedeiro e sua ativação depende da produção prévia de anticorpos e da formação de complexos antígeno-anticorpo. A via alternativa e a via das lectinas participam da resposta inata, sendo que sua ativação depende de componentes específicos presentes na superfície de microorganismos.

As proteínas da via clássica compreendem os componentes C1, C2, C3 e C4. Os componentes C5, C6, C7, C8 e C9 constituem o complexo terminal de ataque à membrana. As proteínas da via alternativa são denominadas de fatores, seguidos de uma letra e compreendem o fator D, o fator B (BF), o fator P (properdina) e C3. Os componentes da via das lectinas são designados pelas abreviaturas MBL (lectina ligante de manose), MASP-1 e MASP-2 (serina proteases associadas à MBL). Os fragmentos gerados por ativação e clivagem proteolítica são designados por letras minúsculas como, por exemplo, os produtos da ativação de C4, C4a e C4b. O fragmento menor recebe sempre a letra “a” enquanto o fragmento maior recebe a letra “b”, exceto para C2a e C2b.

Os componentes inativos são indicados pela letra “i”. As proteínas de membrana do complemento são nominadas tanto pela função que exercem, como por exemplo, fator de decaimento da aceleração (DAF); usando sistemas de grupos de diferenciação (CD59); ou ainda simplesmente numerados consecutivamente como os cinco receptores do complemento (CR1 a CR5) (BING; ALPER, 1995; JAMES, 1997; WALPORT, 2001a).

As funções biológicas do sistema complemento incluem a opsonização de microrganismos, fagocitose, a ativação de células inflamatórias por fragmentos proteolíticos de proteínas do complemento (C3a, C4a, C5a), a citólise mediada pela formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e a solubilização e eliminação de complexos imunes. O complemento também tem um papel importante no desenvolvimento das respostas por anticorpo, e é um dos principais mecanismos efetores das doenças de caráter imunológico (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; MALE, 2003).

A ação mais importante do complemento é facilitar a captação e destruição dos patógenos por células fagocíticas que se dá pelo reconhecimento específico de fragmentos do complemento, por receptores de membrana expressos nessas células (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; JANEWAY, 2002). Esses receptores podem ser divididos em diferentes categorias como os receptores para fragmentos de C3, que estão covalentemente ligados a superfícies ativadas, receptores para os fragmentos solúveis C3a, C4a e C5a (anafilotoxinas), que são intermediários de muitos dos efeitos inflamatórios da ativação do complemento, receptores que regulam a cascata do complemento pela ligação e inibição de proteínas específicas e o receptor de C1q, que é o intermediário da ativação da via clássica, independente de anticorpo, e que favorece a fagocitose (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O complemento é estreitamente regulado por diversas proteínas solúveis e associadas a membranas celulares, que inibem sua ativação em múltiplos passos. Estes mecanismos regulatórios apresentam duas principais funções. Limitam ou bloqueiam a ativação do complemento após a execução apropriada das suas funções e previnem ativações anormais ou constitutivas do complemento na ausência de microorganismos e anticorpos. Deste modo, estes mecanismos regulatórios possibilitam a distinção do próprio e não próprio

pelo complemento e ainda previnem a injúria a tecidos normais (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; JANEWAY, 2002).

3.1.2 Ativação do Sistema Complemento

Três vias estão envolvidas na ativação do complemento e todas convergem para a ativação do componente central ou C3 (Figura 1). Essas compreendem a via clássica, ativada por patógenos ou indiretamente pelo anticorpo ligado ao patógeno, a via das lectinas, ativada por estruturas de polissacarídeos de microorganismos e a via alternativa, ativada na presença de vários patógenos microbianos, fornecendo uma opção de amplificação para as outras duas vias (PRODINGER, 1999; JANEWAY, 2002; MALE, 2003).

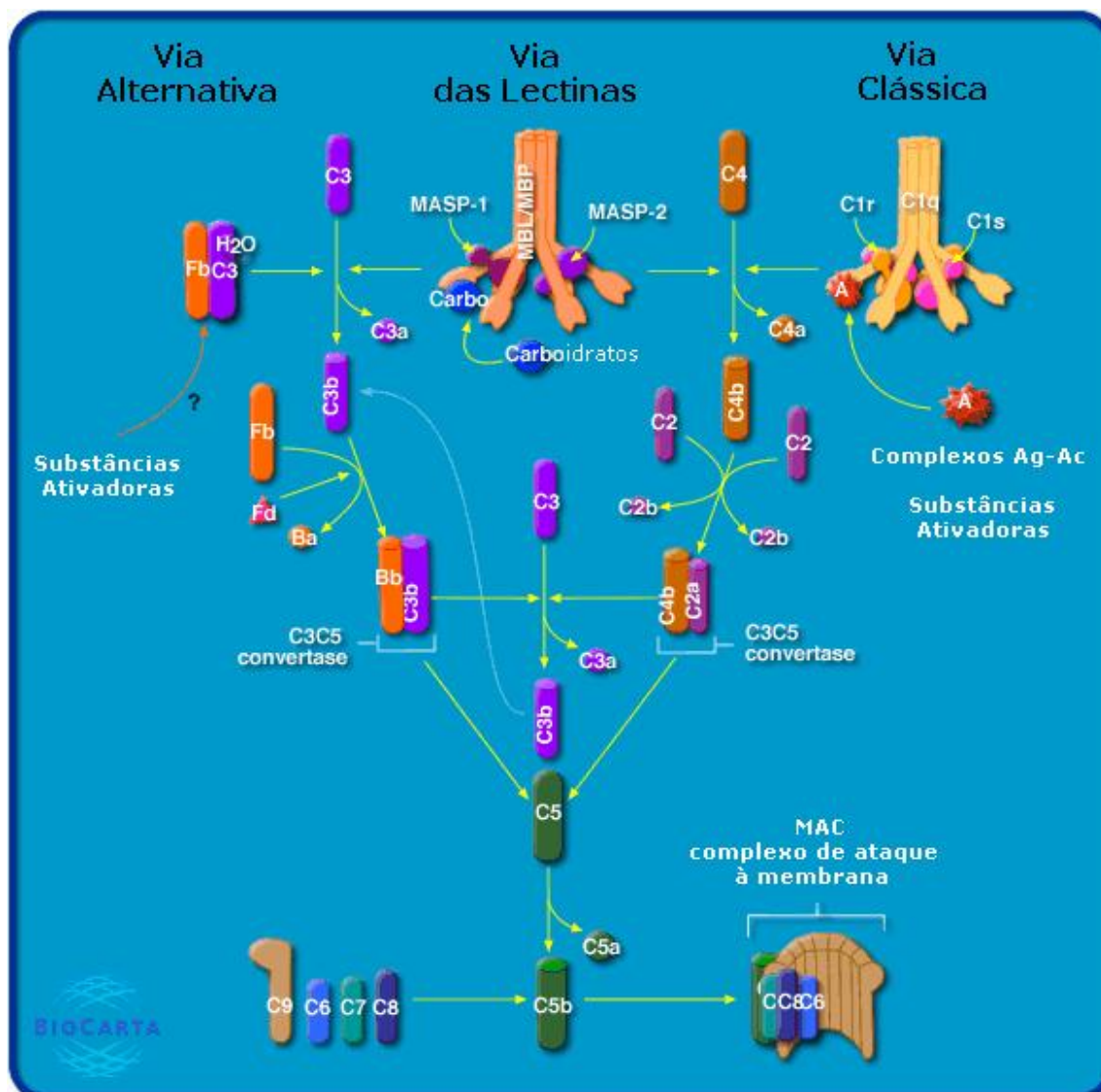
As proteínas do complemento agem como uma cascata enzimática onde cada etapa produz enzimas que atuam na etapa seguinte. As três vias produzem enzimas que clivam C3 em dois fragmentos, C3a e C3b. Este é o ponto central do processo de ativação do complemento. O fragmento menor, C3a, ativa fagócitos e mastócitos enquanto o fragmento maior, C3b, se fixa covalentemente a superfícies celulares das proximidades (MALE, 2003). Os componentes terminais do complemento, cuja ativação é dependente de C3b, geram um complexo protéico macromolecular lipossolúvel chamado complexo de ataque à membrana (MAC), que causa lise osmótica celular (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

3.1.2.1 Via clássica

A via clássica é um importante mecanismo efetor da imunidade humoral. É ativada principalmente pela ligação do primeiro componente desta via, C1, à porção Fc de moléculas de anticorpos que estejam ligados a antígenos (figura 1) (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). As várias classes de anticorpos diferem na eficiência de ativação da via clássica. Somente algumas subclasses de IgG são capazes de ativar o complemento (IgG3, IgG1 e IgG2), enquanto a IgM demonstra grande eficiência nesta ativação por conter dez sítios em potencial de ligação ao C1q através dos domínios CH3. Apesar de ser pentâmera em solução, a IgM não se liga a C1, pois as regiões Fc encontram-se inacessíveis. Porém, quando faz parte de um complexo imune, a molécula

planar é flexionada na configuração de “grampo”, o que expõe os sítios ligantes de C1q.

FIGURA 1 – VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO



FONTE: Adaptado de: www.biocarta.com

Assim, basta uma única molécula de IgM e pelo menos duas de IgG complexadas ao antígeno para ativar o complemento. Como efeito, quanto maior o complexo imune mais eficiente será a ativação da via clássica (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; MALE, 2003).

O componente C1 é uma proteína multimérica composta por uma cadeia da subunidade C1q, e duas cadeias das subunidades C1r e C1s, unidas por íons cálcio (FRANK, 1997). C1q executa a função de reconhecimento da molécula, ligando-se especificamente ao domínio CH3 da porção Fc (CH3-Fc) de imunoglobulinas. C1r e C1s são serina esterases que permanecem inativas até que a molécula de C1 se ligue a um complexo imune. A ligação de C1q a IgM ou IgG induz à uma mudança conformacional que leva a uma ativação enzimática de C1r que cliva e ativa C1s. C1s, por sua vez, atua nos próximos dois componentes da via clássica, clivando C4 e C2 para gerar dois fragmentos maiores, C4b e C2a, que juntos formam a C3 convertase da via clássica (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; JANEWAY, 2002). Os fragmentos menores, C4a e C2a vão atuar como anafilotoxinas.

A atividade mais importante da C3 convertase é clivar um grande número de moléculas de C3 em C3b, as quais recobrem a superfície alvo e juntamente com C4b2a, formam a C5 convertase da via clássica. Ao mesmo tempo, o outro produto da clivagem, C3a, inicia uma resposta inflamatória local (JANEWAY, 2002).

A molécula de C3 consiste em 2 cadeias denominadas α e β , ligadas por pontes dissulfeto. Quando C3 é ativado, o peptídeo C3a é clivado da cadeia α . Como resultado, a ligação tioéster interna no fragmento C3b torna-se exposta e reage formando pontes covalentes com aceptores vizinhos (FRANK, 1997; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

3.1.2.2 A via alternativa

A via alternativa é ativada na ausência de anticorpo, constituindo um mecanismo da imunidade inata. Essa via gera as duas formas de C3 convertase, uma solúvel e outra ligada à membrana, que catalisam a proteólise de C3 (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). A via alternativa é constantemente ativada, em baixa proporção, que aumenta na presença de superfícies ativadoras adequadas como as paredes celulares das bactérias e fungos (figura 1). A ligação tioéster interna no C3 nativo é suscetível a uma hidrólise espontânea por água, gerando uma forma ativa de C3. Esta ativação contínua é chamada de “tickover”. Potencialmente, o C3 ativado pode se ligar ao Fator B, uma proteína circulante similar a C2, que então é clivado pelo Fator D

(serina protease semelhante a C1), para formar uma convertase de C3 (C3bBb). A ocorrência deste evento depende do ambiente local. No plasma e na superfície das células corporais, a C3 convertase é hidrolisada pela água e inativada, porém, próximo das superfícies ativadoras, essa permanece atuando sobre mais moléculas de C3 (FRANK, 1997; MALE, 2003).

A via alternativa gera um mecanismo intrínseco de amplificação para o sistema complemento. O complexo enzimático C3bBb ligado à superfície gera mais moléculas de C3b e essas, aos poucos, são depositadas na mesma superfície, formando mais C3 convertases. Assim, C3b tanto é um componente da C3 convertase assim como um produto gerado pela ação desta. Esta situação permite um “feedback” positivo para a amplificação da via alternativa. Desta forma, o C3b gerado pela via clássica pode deflagrar a ativação da via alternativa enquanto a C3 convertase da via alternativa também representa um mecanismo de amplificação para a ativação da via clássica. A magnitude deste mecanismo de amplificação é demonstrada pelo fato de que milhares de moléculas de C3b podem ser geradas em uma superfície celular dentro de 5 minutos de iniciação da via alternativa em fase sólida (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O complexo C3bBb é extremamente instável e se dissocia rapidamente, e é estabilizado por uma proteína chamada properdina (P), que diminui sua dissociação e permite que a cascata continue (FRANK, 1997). A convertase C3bBbP é capaz de clivar o C3 de modo semelhante ao C4b2a, gerando os subcomponentes C3b e C3a. C3b liga-se a C3bBbP formando a C5 convertase da via alternativa (ANTUNES, 1992).

3.1.2.3 A via das lectinas

O principal componente da via das lectinas é a MBL que, assim como C1q, pertence à família das colectinas, proteínas com hastes colagenosas e domínios lectina. Além da MBL, a ficolina/p35 e o antígeno Hakata são capazes de ativar essa via. Essas moléculas pertencem à família das ficolinas, proteínas que possuem domínios colagenosos e de fibrinogênio (PRODINGER, 2003).

A via das lectinas é ativada pela ligação da MBL a resíduos de manose e outros açúcares que estão acessíveis e organizados em um padrão que

permite sua adesão a muitos patógenos e/ou superfícies celulares (figura 1) (JANEWAY, 2002; MALE, 2003).

No plasma, a MBL é encontrada associada às serinas proteases MASP1, MASP2 e MASP3. A MASP1 e a MASP2 são homólogas a C1r e C1s, embora a estequiometria do complexo ainda seja desconhecida. Quando a MBL se liga aos grupamentos manose terminais nos carboidratos bacterianos, por exemplo, MASP1 e MASP2 são ativadas e continuam a ativar a via clássica independente do anticorpo. MASP2 cliva C4 e C2, enquanto MASP1 cliva C3 e C2 (MALE, 2003; PRODINGER, 2003).

Vários tipos de células, incluindo leucócitos, plaquetas, células endoteliais e células de músculo liso, expressam receptores para C1q, que também atuam como receptores para colectinas. Essa ligação induz sinais que aumentam as atividades metabólicas e fagocíticas dos leucócitos, com destruição de microorganismos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O controle da via das lectinas parece ser executado principalmente pela ligação covalente da molécula C1-INH a MASPs ativas e, em geral, é bastante similar ao controle da via clássica (PRODINGER, 2003).

Aspectos específicos e detalhados da MBL serão abordados no item 3.2.

3.1.2.4 O complexo de ataque à membrana (MAC)

As C5 convertases geradas pelas vias clássica e alternativa iniciam a ativação dos componentes terminais do complemento, culminando na formação do complexo de ataque à membrana (MAC). As proteínas envolvidas nesta via terminal incluem C5, C6, C7, C8 e C9. Esse processo é iniciado com a quebra de C5 pelas duas C5 convertases. Esse é o último passo enzimático da cascata do complemento, pois os passos subseqüentes envolvem a ligação e polimerização de proteínas intactas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Assim que o C5 é clivado, C5b liga-se a C6 e C7 formando um complexo anfifílico, que se insere nas membranas celulares. C8 então, une-se a este complexo e se insere na membrana celular. O complexo C5b-8 promove a ruptura e a lise das membranas de maneira limitada, um efeito que é potencializado pela incorporação de C9. Quando mais de seis moléculas de C9 compõem o complexo, estas polimerizam-se formando poros que permitem o fluxo de solutos e de eletrólitos pelas membranas. O ambiente iônico do fluido

extracelular comunica-se com o intracelular, provocando desequilíbrio osmótico e químico. A água entra na célula pela alta concentração osmótica interna, rompendo a membrana celular. O grau de dano causado depende do tipo celular. Um pequeno número de poros pode causar a lise de um eritrócito, mas as células nucleadas toleram um maior número de MACs antes de serem destruídas, embora a presença de MACs possa comprometer a função celular (FRANK, 1997; MALE, 2003).

3.1.3 Mecanismos de regulação da cascata do complemento

Considerando os efeitos lesivos do complemento e a maneira como sua ativação é rapidamente amplificada por meio da indução da cascata enzimática, diferentes passos das vias de ativação são estreitamente regulados para prevenir essa ativação em células normais próprias e para limitar a sua duração na superfície de microorganismos e de complexos antígeno-anticorpo. A regulação do complemento é mediada por várias proteínas circulantes e de membrana, como se observa no quadro 1, e está voltada para os eventos centrais das três vias, como a dissociação da C3 convertase, degradação enzimática de C3b e inibição da inserção do MAC a membranas. Muitas destas proteínas, assim como muitas proteínas da via clássica e alternativa, pertencem a uma família chamada “Reguladores da Atividade do Complemento (RCA)” e são codificados por genes homólogos adjacentes (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; JANEWAY, 2002; MALE, 2003).

3.1.4 Conseqüências biológicas da ativação do complemento

As funções do complemento estão relacionadas tanto com a lise celular pela formação do MAC, quanto com os efeitos biológicos dos fragmentos gerados durante a sua ativação.

Os fragmentos C3b e C3bi ligam-se covalentemente a superfícies celulares de partículas estranhas como vírus, bactérias, células tumorais e complexos imunes solúveis, promovendo opsonização, que associada à fagocitose, representa um dos principais mecanismos de defesa contra infecções na imunidade inata e adaptativa (BING; ALPER, 1995; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). Desta maneira, a presença do C1q-R em diversas

QUADRO 1 – PROTEÍNAS REGULATÓRIAS DA ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO

Nome	Distribuição	Interação com	Funções
Inibidor de C1 (C1 INH)	Plasma	C1r e C1s	Inibidor de serina protease; liga-se a C1r e C1s, dissociando-os de C1q, bloqueando sua participação na via clássica
Fator I	Plasma	C4b, C3b	Serina protease; cliva e inativa C3b e C4b, usando o Fator H, MCP, C4BP ou Cr1 como co-fatores
Fator H	Plasma	C3b	Liga-se ao C3b deslocando Bb da C3 convertase da via alternativa; co-fator para o Fator I para a clivagem de C3b
C4BP (proteína ligante de C4)	Plasma	C4b	Liga-se ao C4b, deslocando C2b da C3 convertase da via clássica; co-fator para o Fator I para a clivagem de C4b
MCP, CD46 (proteína co-fatora de membrana)	Leucócitos, células endoteliais e epiteliais	C3b, C4b	Co-fator para o Fator I mediando a inativação de C3b e C4b
DAF (Fator de decaimento da aceleração)	Células sanguíneas, endoteliais e epiteliais	C4b2b, C3bBb	Desloca C2b de C4b e Bb de C3b (dissociação das C3 convertases)
CD59	Células sanguíneas, endoteliais e epiteliais	C7, C8	Bloqueia a ligação de C9 e previne a formação do MAC
Proteína S	Plasma	C5b-7	Inibe a formação do MAC
SP-40,40	Plasma	C5b-9	Modula a formação do MAC
Carboxipeptidase N	Plasma	C3a, C4a e C5a	Inativa as anafilotoxinas por clivar a arginina carboxi terminal dos peptídeos

NOTA: MAC = complexo de ataque à membrana

FONTE: Adaptado de ABBAS, LICHTMAN e POBER (1997 e 2000).

células permite que essas englobem patógenos e complexos imunes-C1q opsonizados pela MBL o que induz a produção de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e a citotoxicidade celular (ROSS, 1992; PRODINGER, 1999).

Outra propriedade biológica do complemento é a solubilização e depuração de complexos imunes que são freqüentemente formados na circulação. A ligação do complemento nas imunoglobulinas pode bloquear estericamente as interações não covalentes entre regiões Fc de moléculas de IgG justapostas, inibindo a formação de novos complexos ou promovendo a sua desestabilização (BING; ALPER, 1995; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000). O receptor CR1, presente em fagócitos mononucleares, neutrófilos, células B e células dendríticas foliculares, é mediador dos processos de fagocitose e ativação celular, e também está presente nos eritrócitos humanos. Isto permite que os complexos imunes circulantes opsonizados com C3b e C4b, liguem-se aos eritrócitos e sejam transportados para o fígado e baço onde são removidos e eliminados pelos fagócitos residentes (MALE, 2003).

Os receptores para o complemento contribuem também com outra propriedade biológica desse sistema que é a remoção de células apoptóticas pelos macrófagos. A ativação do complemento é promovida pela ligação de C1q, MBL, proteína C reativa e IgM na superfície de células apoptóticas, o que leva a interação com receptores presentes em macrófagos e a captura e destruição dessas células (WALPORT, 2001b; MALE, 2003).

Alguns fragmentos gerados durante a ativação do complemento possuem ainda efeito pró-inflamatório. As anafilotoxinas C5a, C4a e C3a, de baixo peso molecular, se difundem do sítio de produção atuando em receptores específicos (C5aR, C4aR e C3aR), expressos principalmente em mastócitos, neutrófilos monócitos e eosinófilos, amplificando a injúria tecidual e o afluxo e ativação das células inflamatórias (ROSS, 1992; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; WALPORT, 2001b).

Os componentes C5a e C3a agem nos mastócitos induzindo a degranulação e a liberação de aminas vasoativas, incluindo histamina e 5-hidroxitriptamina, que aumentam a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo local. A liberação secundária das quimiocinas dos mastócitos induz o acúmulo celular e o próprio C5a age diretamente nos receptores presentes nos monócitos e neutrófilos induzindo sua migração para sítios de inflamação

aguda com subsequente ativação (MALE, 2003). As ações das anafilotoxinas são reguladas em parte por uma enzima chamada carboxipeptidase-N, a qual remove uma arginina-C-terminal comum à C3a, C4a e C5a. As formas resultantes C3a e C4a *des Arg* são completamente inativas e a forma *des Arg* do C5a possui apenas 10% da atividade biológica da sua forma intacta (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O ponto final da ativação do complemento promove a organização do complexo de ataque à membrana (MAC) que se insere em bicamadas lipídicas levando a citólise. Deficiência genética dos componentes do MAC resulta em maior suscetibilidade a infecções por bactérias do gênero *Neisseria* (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000; MALE, 2003).

Em células nucleadas, a ativação do complemento é freqüentemente sublítica, no que diz respeito à natureza quantitativa do MAC. Esta ativação promove uma certa proteção à célula, pois se opõe à lise provocada por um ataque único, como ocorre em eritrócitos. Além disso, o ataque sublítico estimula a neossíntese protéica pelas células protegidas, estimula o metabolismo do ácido araquidônico e ativa leucócitos polimorfonucleares. Além de elevar transitoriamente o cálcio intracelular e ativar a proteína quinase C, também tem o potencial de induzir atividade pró-coagulante e pró-inflamatória. Logo, a presença do MAC na superfície de células do sistema imunológico viáveis sugere um papel modulatório na fisiologia da célula à qual se ligou. É possível que a principal função biológica da cascata terminal do complemento, como um importante braço efetor da defesa humoral do hospedeiro, vá além daquela originalmente descrita (PRODINGER et al., 1999).

3.1.5 O sistema complemento na doença

O complemento pode estar envolvido nas doenças humanas de diferentes maneiras. A deficiência de qualquer componente protéico pode levar a padrões anormais de ativação do sistema. A ausência de um dos componentes iniciais de uma das vias de ativação ou dos componentes formadores do MAC pode levar a uma ativação deficiente do complemento. Deficiência dos componentes regulatórios pode levar a ativação intensa do complemento no local e momento indesejados, causando inflamação excessiva e lise celular (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

O sistema pode também ser ativado em resposta a estímulos anormais, como microorganismos persistentes, anticorpos contra antígenos próprios ou complexos imunes depositados em tecidos. Nestas doenças infecciosas ou auto-imunes, os efeitos inflamatórios ou líticos do complemento podem contribuir significativamente para a patogenia da doença. O complemento é crucial para o processamento de complexos imunes. Quando quantidades excessivas destes complexos são depositadas nos tecidos, a constante ativação do complemento causa injúria a tecidos vizinhos (PRODINGER et al., 1999; ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2000).

A participação do complemento na patogenia da DC com conseqüente injúria na mucosa intestinal será abordada no item 3.4.8.

3.2 A LECTINA LIGANTE DE MANOSE (MBL)

A MBL é uma colectina que está envolvida na primeira linha de defesa do hospedeiro contra bactérias, fungos e vírus (SUPER et al., 1992). Esta proteína liga-se a uma grande variedade de açúcares como N-acetil-D-glucosamina, manose, N-acetil-manosamina, fucose e glucose, expressos por diferentes microorganismos e estruturas, mediando a fagocitose e a ativação do complemento. Uma vez que pode ligar-se a vários açúcares, a MBL atua efetivamente como um anticorpo universal. Muitos destes açúcares não estão normalmente expostos em superfícies celulares de mamíferos em grandes quantidades, o que dificulta o reconhecimento de estruturas próprias pela MBL e favorece uma interação mais apropriada com superfícies celulares microbianas (TURNER, 1996).

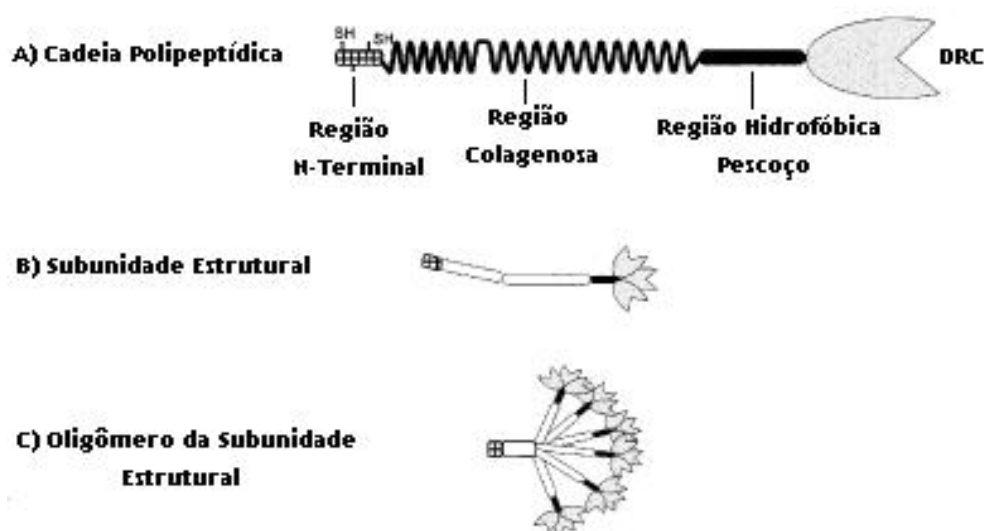
3.2.1 Estrutura

A MBL pertence a uma subfamília de proteínas conhecidas como colectinas, cujos membros apresentam domínios de reconhecimento de carboidratos associados a estruturas colagenosas (HOLMSKOV et al., 1994; EPSTEIN et al., 1996; TURNER, 2003).

A forma circulante da MBL é constituída por oligômeros estruturados por subunidades que se formam pela associação de três cadeias polipeptídicas idênticas de 32kDa. Cada cadeia polipeptídica é composta por um domínio de

reconhecimento de carboidratos (DRC), uma região hidrofóbica chamada de pescoço, uma região colagenosa e uma região N-terminal rica em cisteína (figura 2). As três cadeias interagem através de suas regiões colagenosas formando uma tripla hélice. A região hidrofóbica de cada cadeia adota uma forma espiralada e os domínios de reconhecimento de carboidratos apresentam características de proteínas globulares (TURNER, 2003). O trímero é estabilizado por interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto entre as regiões N-terminais ricas em cisteína de cada cadeia (HOLMSKOV et al., 1994) e associa-se em oligômeros de duas a seis subunidades formando uma estrutura quaternária com a aparência de um “buquê de tulipas”. A sua estrutura tridimensional é similar à do componente C1q do sistema complemento (HOLMSKOV et al., 1994; HANSEN; HOLMSKOV, 1998; GABIUS et al., 2002).

FIGURA 2 – ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO DA MBL



NOTA: DRC = Domínio de Reconhecimento de Carboidrato

FONTE: Adaptado de PRESANIS, KOJIMA E SIM, 2003

Estudos recentes mostraram que aminoácidos altamente conservados nas alças peptídicas externas dos DRCs formam pontes coordenadas com cálcio e os grupos hidroxilas 3 e 4 nos resíduos de açúcares aos quais a MBL se liga. A distância entre os três domínios lectina é cerca de 45Å (SHERIFF;

CHANG; EZERKOWITZ, 1994) o que torna inviável a ligação a uma molécula simples de manose e favorece tal interação com padrões repetitivos de açúcares (WEIS; DRICKAMER, 1994). Embora a afinidade de cada interação lectina-açúcar seja de apenas 10^{-3} M (IOBST et al., 1994), a oligomerização da MBL permite uma ávida ligação aos carboidratos, dada pela presença de múltiplos sítios que se ligam simultaneamente. Formas com menor grau de polimerização ligam-se menos avidamente aos açúcares, além de apresentarem falhas na ativação do complemento (CHEN; WALLIS, 2001).

A ativação do complemento pela via das lectinas exige a complexação da MBL, através de sua região colagenosa, com diferentes proteases denominadas MASP-1, MASP-2, MASP-3 e a proteína de 19KDa sMAp ou MAp19 (TURNER, 1996; PETERSON; THIEL; JENSENIUS, 2001; ROSSI et al., 2001). A bioquímica deste complexo ainda não foi determinada.

3.2.2 Genética e concentração sérica

Os genes das colectinas humanas estão todos situados no cromossomo 10 (q21-24) (HANSEN; HOLMSKOV, 1998). O gene da MBL humana que codifica um produto protéico é chamado de *MBL-2* e compreende 4 exons e 3 íntrons. O exon 1 codifica o peptídeo sinal, a região N-terminal rica em cisteína e parte da região colagenosa, enquanto o exon 2 codifica o restante da região colagenosa. O exon 3 codifica a região hidrofóbica espiralada conhecida como pescoço e o exon 4 o DCR (TURNER, 2003).

Em recém-natos, a concentração da MBL corresponde a 60% da encontrada em adultos (THIEL et al., 1995). A concentração sérica da MBL varia significativamente, podendo ir de 0 a 5000ng/ml em indivíduos saudáveis (PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003; TURNER, 2003), com aumento de 2 a 3 vezes durante resposta de fase aguda (THIEL et al., 1992), embora muito mais lento do que a proteína C-reativa. A variação na concentração é atribuída a mutações no exon 1 do gene da MBL associadas à vários sítios polimórficos da região promotora do gene. Este fato resulta em defeitos na polimerização levando a deficiência funcional, além de influenciar o nível de expressão da proteína (PRESANIS; KOJIMA; SIM, 2003; TURNER, 2003). As mutações estruturais do exon 1 do gene compreendem trocas de bases nos códons 54, 57 e 52 e são denominadas de variantes B (glicina por ácido aspártico ou GGC

por GAC), C (glicina por ácido glutâmico ou GGA por GAA) e D (cisteína por arginina ou CGT por TGT), respectivamente. O alelo normal selvagem é chamado de A (LIPSCOMBE et al., 1992; MADSEN et al., 1994; GARRED et al., 2003). Indivíduos que são homozigotos (0/0, onde 0 pode ser B, C ou D) para um alelo mutante produzem MBL em quantidades indetectáveis por ELISA, enquanto os heterozigotos (A/0) para a mutação possuem concentrações séricas significativamente reduzidas quando comparados com indivíduos homozigotos (A/A) para o alelo selvagem (LIPSCOMBE et al., 1992).

Os sítios polimórficos da região promotora estão nas posições -550, -221 e +4 do gene da MBL e representam os *loci* H/L, X/Y e P/Q respectivamente (MADSEN et al., 1995). Estes três *loci* estão intimamente ligados e devido ao desequilíbrio da ligação, apenas sete haplótipos (HYPA, LYQA, LYPA, LXPA, LYPB, LYQC e HYPD) são comumente encontrados. Destes, o haplótipo HYP está associado com concentrações plasmáticas normais e altas de MBL, enquanto concentrações baixas são freqüentemente associadas ao haplótipo LXP (MADSEN et al., 1998).

3.2.3 Funções

A MBL é um dos mais versáteis componentes do sistema imune inato, apresentando características funcionais análogas à IgM, IgG e C1q (TURNER, 1996). Há evidências de que a proteína possua pelo menos quatro funções distintas, dentre as quais a ativação do complemento tem sido a melhor estudada. A ativação do complexo MBL/MASP ocorre após a ligação da molécula à resíduos de carboidratos presentes na superfície de diversos microorganismos como leveduras (TURNER et al., 1986), bactérias (EMMERIK et al., 1994; GARRED et al., 1994), vírus (EZERKOWITZ et al., 1989; HARTSHORN et al., 1993) e parasitas (GREEN et al., 1994). Esta via de ativação já foi descrita no item 3.1.2.3.

A promoção da opsonização e da fagocitose, independentes de complemento, representam outra função da MBL. Embora o mecanismo desta função não tenha sido exatamente elucidado, presume-se que se houver atuação direta da MBL como opsonina, há uma interação com receptores específicos para colectinas como cC1qR/calreticulina, C1qRp e CR1, expressos na superfície de células fagocíticas (KLICKSTEIN et al., 1997;

GHIRAN et al., 2000). Entretanto, é possível que a MBL esteja meramente favorecendo a fagocitose através do reconhecimento de anticorpos e complemento pelos fagócitos.

Estudos recentes têm sugerido a atuação da MBL em processos inflamatórios, através do estímulo na liberação de citocinas pro-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6. Segundo JACK et al. (2001), esta modulação é dose dependente. Além disso, recentemente demonstrou-se que a proteína pode ligar-se à células T apoptóticas e neutrófilos polimorfonucleares através dos DCR. A subsequente internalização pelos fagócitos mononucleares parece estar associada ao receptor cC1qR que se liga à MBL através da região colagenosa e ao receptor de α_2 -macroglobulina, CD91, presentes na superfície do fagócito. A interação simultânea destes receptores com a MBL inicia o engolfamento da célula apoptótica através de macropinocitose (OGDEN et al., 2001).

3.2.4 A MBL nas doenças

Em 1989, SUPER et al. observaram que a deficiência de MBL no soro de humanos era a base para o defeito na opsonização de microorganismos. Dois anos depois, TURNER et al. (1991) demonstraram que baixas concentrações da proteína estavam associadas a infecções recorrentes na infância.

A partir daí, uma grande variedade de afecções clínicas tem sido associada à deficiência de MBL, tais como a suscetibilidade aumentada para infecções bacterianas e virais (EISEN; MINCHINTON, 2003), a aterosclerose (RUGONFALVI-KISS et al., 2002), leucemias (SCHMIEGELOW et al., 2002) e até abortos (CHRISTIANSEN et al., 1999).

Entretanto, altas concentrações de MBL podem favorecer a infecção por alguns parasitas intracelulares como a *Leishmania*, que utiliza a opsonização por C3 e seu receptor para entrar na célula do hospedeiro. Assim, mecanismos que diminuam a ativação do complemento, podem dificultar a entrada do parasita nas células (SANTOS et al., 2001; BONAR; CHMIELA; ROZALSKA, 2004).

A associação da deficiência de componentes da via clássica do complemento com doenças auto-imunes está bem estabelecida (FIKE, 1997a;

TURNER, 2003). Diversos estudos têm relacionado valores baixos de MBL ou frequência aumentada dos alelos mutantes em pacientes com doenças auto-imunes (LAU et al., 1996; SULIVAN et al., 1996; DAVIES et al., 1997), sugerindo que uma associação similar à da via clássica também possa ocorrer com a MBL e a via das lectinas. Uma relação da MBL com doenças auto-imunes como o lúpus eritematoso sistêmico (VILLARREAL et al., 2001; HUANG et al., 2003), colite ulcerativa e doença de Crohn (RECTOR et al., 2001; SEIBOLD et al., 2004), artrite reumatóide (IP et al., 2000; SAEVARSDOTTIR et al., 2001) e síndrome de Sjogrens (TSUTSUMI et al., 2001; WANG et al., 2001), entre outras, tem sido demonstrada por diferentes autores. Tais associações suportam a hipótese de que a proteína possui um importante papel na regulação da resposta imunológica envolvida nessas doenças.

Baixas concentrações de MBL têm sido associadas a abortos espontâneos. Essa relação foi evidenciada em mulheres sadias por KILPATRICK; BEVAN e LISTON (1995) e CHRISTIANSEN et al (1999) os quais sugerem que uma resposta imune alterada no ambiente fetal seja responsável pela suscetibilidade aumentada ao aborto.

Estudos recentes sugerem que a MBL também é capaz de modular a gravidade de doenças infecciosas como a AIDS (GARRED et al., 1997; MASS et al., 1998) e doenças auto-imunes como artrite reumatóide (GARRED et al., 2000; GRAUDAL et al., 2000; IP et al., 2000).

Altos valores séricos de MBL podem conferir, em certas circunstâncias, desvantagens biológicas (EZERKOWITZ, 1998; TURNER; HAMVAS, 2000) por exacerbar a inflamação sistêmica e local através da ativação do complemento e produção de citocinas inflamatórias (JACK et al., 2001; FIANE et al., 2003). Diferentes autores demonstraram que altos valores de MBL podem estar envolvidos na patogênese da complicação micro e macrovascular no diabetes mellitus tipo 1 (HANSEN et al., 2004; HOVIND et al., 2005), da lesão cardíaca em pacientes com febre reumática (SHAFRANSKI et al., 2004), na patogênese das manifestações renais da púrpura de Henoch-Schonlein (ENDO et al., 2000), na nefropatia por IgA (ENDO et al., 1998), e em outras formas de glomerulonefrites humanas (LHOTTA et al., 1999).

Os relatos de associação da MBL com a DC são escassos na literatura (BONIOTTO et al., 2002; ILTANEN et al., 2003; BONIOTTO et al., 2005) e serão abordados no item 3.4.9.

3.3 A PROTEÍNA C-REATIVA

A proteína C-reativa (PCR), assim denominada pela capacidade de ligar-se à molécula C da parede celular do pneumococo, é sintetizada no fígado e liberada no sistema circulatório em resposta a estímulo desencadeado por condições inflamatórias e diferentes doenças (DU CLOS, 2000). Com esses estímulos, a PCR pode aumentar rapidamente até 1000 vezes na circulação sanguínea, entre 4 a 8 horas após o processo inflamatório agudo, sendo por isso denominada de proteína de fase aguda. Assim que o organismo retorna a condições fisiológicas normais, a concentração sérica decresce rapidamente (VOLANAKIS, 2001).

A principal função biológica da PCR consiste em promover defesa contra patógenos e eliminação de células necróticas e apoptóticas, exercendo, portanto, importante papel na imunidade inata do hospedeiro. Desempenha suas funções através do recrutamento dos diversos sistemas de defesa, como ativação do sistema complemento e estímulo da resposta imune celular e humoral. A PCR pode induzir a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1 (molécula de adesão -1) e selectina-E e pode ainda aumentar a destruição de células endoteliais, mediada por linfócitos T e, através da opsonização, pode estimular a fagocitose pelos macrófagos (DU CLOS, 2000).

A PCR reconhece patógenos através da interação com certos ligantes, como por exemplo, a ligação cálcio dependente ao polissacarídeo C do pneumococo. A fosfatidilcolina (Phc), presente em diversas bactérias, fungos e membranas celulares danificadas, constitui outro ligante da proteína. A cromatina do núcleo celular, quando exposta ou desnaturada na apoptose ou necrose, também se torna ligante de PCR. Além disso, a proteína interage com receptores Fc das células levando ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez, intensificam a resposta inflamatória (SZALAI et al., 1997).

A importância do papel biológico da PCR ainda permanece um enigma, visto que até o momento não se tem encontrado deficiência da proteína *in vivo* (DU CLOS, 2000).

A quantificação da PCR circulante consiste em uma das avaliações rotineiras e consagradas de processos inflamatórios e tem sido usada para monitorar a inflamação em doenças, bem como para monitorar presença de infecção e sucesso no tratamento. Embora a DC apresente caráter inflamatório, os relatos entre DC e PCR são escassos e inexistem correlações entre essa proteína e a MBL na DC.

3.4 A DOENÇA CELÍACA

3.4.1 Aspectos Gerais

A DC é considerada como doença inflamatória intestinal crônica, imunologicamente mediada e geneticamente determinada, que se desenvolve por hipersensibilidade vitalícia a proteínas específicas de cereais como trigo, centeio, cevada e aveia (ELLIOT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998; GREEN; JABRI, 2003; HAMER, 2005).

Estudos epidemiológicos mostram que a DC é bastante comum, chegando a acometer uma entre 250 pessoas (GREEN; JABRI, 2003), e embora seja considerada de distribuição mundial, ocorre com maior frequência em países anglo-saxônicos e nórdicos. Afeta mais mulheres do que homens, sem restrição de idade, porém ocorre mais frequentemente em adultos do que em crianças (HOULSTON; FORD, 1996). Apresenta uma forte condição hereditária, com prevalência variando de 8 a 18% em familiares de pacientes celíacos. A doença é grave enfermidade para aproximadamente um terço dos pacientes, uma vez que a maioria não apresenta sintomas clínicos (HAMER, 2005).

A DC foi descrita em detalhes pela primeira vez na década de 1880, por GEE¹, citado por SCHUPPAN (2000). Em 1950, DICKE², também citado por

¹GEE, S. On the celiac affection. St. Bartholomeus Hosp Rep, v. 24, p. 17-20, 1888.

²DICKE, W. K. Investigation of the harmful effects of certain types of cereal on patients with celiac disease. Netherlands, 1950. (Doctoral thesis). University of Utrecht.

SHUPPAN (2000), descobriu o papel etiológico do trigo e grãos relacionados na DC. PAULLEY (1954), através de biópsias intestinais obtidas cirurgicamente, fez a descrição acurada da histologia da doença.

Hiperplasia de criptas, atrofia das vilosidades e aumento do número de linfócitos intraepiteliais (LIE) são características clássicas desta enteropatia. Pacientes com DC grave apresentam má absorção de nutrientes essenciais e frequentemente desenvolvem perda de peso e diarreia prolongada com queixas abdominais. Alguns pacientes podem apresentar anemia por deficiência de ferro ou folato, osteoporose, osteomalacia, fadiga crônica, intolerância a derivados do leite, problemas dentários, demência, baixa estatura e neuropatia. A doença apresenta-se ainda associada a um padrão aumentado de infertilidade, doenças auto-imunes e linfomas (GREEN; JABRI, 2003). A associação com outras doenças auto-imunes é freqüente tanto nos pacientes quanto nos familiares com DC (KING; CICLITIRA, 2000).

O tratamento bem sucedido da DC requer abstinência dos cereais que contém glúten, por toda a vida do indivíduo (ELLIOT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998). Ainda assim, pode levar meses ou anos para que o intestino se recupere completamente e volte a apresentar morfologia normal (HAMER, 2005). Recidivas das manifestações clínicas são observadas com o retorno do glúten à alimentação.

3.4.2 Influências ambientais na DC

Sabe-se que o trigo, o centeio, a cevada e possivelmente a aveia são cereais tóxicos a indivíduos com DC. As proteínas do trigo são comumente diferenciadas em três classes: as albuminas, que são extraídas em água; as globulinas, extraídas em sal e a fração glúten remanescente (HAMER, 2005). Essa fração possui um grupo de proteínas insolúveis em álcool, denominadas gluteninas, e outro grupo de proteínas solúveis em álcool e aparentemente responsáveis pelo desencadeamento e exacerbação da DC, denominadas prolaminas. A fração prolamina do trigo, centeio, cevada e aveia compreende respectivamente, a gliadina, secalina, hordeína e avenina (GODKIN; JEWELL, 1998; KOTZE, 2001a).

A gliadina possui porções repetidas de duas ou mais glutaminas associadas a prolinas em sua composição. O alto conteúdo destes

aminoácidos também é comum as prolaminas do centeio e da cevada, enquanto as prolaminas não tóxicas do arroz e milho, apresentam baixo conteúdo destes aminoácidos. A aveia, que possui uma composição intermediária destes aminoácidos, tem sua toxicidade questionada e seria lesiva à mucosa intestinal somente em quantidades excessivas (GODKIN; JEWELL, 1998; SCHUPPAN, 2000).

Não se sabe como ocorre a sensibilização inicial às frações tóxicas, porém sabe-se que em uma resposta dose dependente, estas proteínas induzem a um processo inflamatório no intestino e quando retiradas resultam na regressão do mesmo (MARSH, 1992). Sugere-se que possa haver uma permeabilidade intestinal aumentada a macromoléculas com apresentação inapropriada da gliadina ao sistema imune (ELLIOT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

Recentemente, tentativas de cultivo de cereais sem genes responsáveis pelas agressões à mucosa têm sido feitas (trigos tetraplóides) (KOTZE, 2005). É possível “silenciar” partes dos genes do trigo, com conseqüente baixa na concentração de possíveis peptídeos tóxicos. Porém, devido ao alto grau de homologia das seqüências na família dos cereais, a eliminação total das frações tóxicas deve ser descartada (HAMER, 2005).

Embora não necessariamente iniciando a doença, eventos como cirurgias, parto, gastroenterite e terapia com antibióticos, podem precipitar a instalação dos sintomas na sensibilidade latente ao glúten (ELLIOT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

3.4.3 Classificação e apresentação clínica

A classificação da DC é baseada na presença de sintomas gastrointestinais. Doença *ativa ou clássica* refere-se a situações com diarreia, com ou sem má absorção e está associada a uma substancial morbidade causada por sintomas gastrointestinais crônicos, perda de peso, doença metabólica dos ossos, anemia e doenças generalizadas. A forma *não-clássica* ou *atípica* divide-se em dois tipos: atípico digestivo, com sintomas digestivos mais discretos ou com constipação intestinal, e um segundo tipo denominado atípico extradigestivo, com sintomas tais como baixa estatura, anemia, tetania etc. Na doença *assintomática* ou *silenciosa*, os sintomas gastrointestinais são

ausentes ou não proeminentes, embora o paciente possa reportar outros sintomas não intestinais. Alterações ocultas como menor densidade óssea, deficiência de ferro ou folato e outras doenças auto-imunes associadas acometem a maioria destes pacientes. A forma *latente* está presente em indivíduos que irão desenvolver a doença no futuro ou que já tiveram a doença, mas no momento da investigação, apresentam mucosa intestinal normal com a ingestão de glúten (TURSI et al., 2001a; GREEN; JABRI, 2003; KOTZE, 2005).

A apresentação clínica da DC é bastante variável e depende da idade, sensibilidade ao glúten, quantidade de glúten ingerido da dieta, além de fatores ainda desconhecidos (DEWAR; CICLITIRA, 2005). Acomete a região proximal do intestino delgado, o que freqüentemente resulta em má absorção de ferro, ácido fólico, cálcio e vitaminas lipossolúveis, acarretando deficiência destes componentes além da densidade óssea reduzida.

A diarreia se dá principalmente pela progressão da doença para a região distal do intestino delgado. Quando apenas a região proximal do intestino é acometida, a região distal pode compensar e absorver os produtos da digestão de gorduras e carboidratos. Os pacientes podem ainda apresentar sintomas neurológicos (ALLAEDINI et al., 2002), ataxia (HADJJIVASSILIOU et al., 1993), menos freqüentemente, estomatite aftosa (LAHTEENOJA et al., 1998), artrite (LEPORE et al., 1996) e concentrações anormais das transaminases hepáticas (BARDELLA et al., 1995). Uma variedade de outras doenças está associada à DC, incluindo diabetes mellitus tipo I, intolerância à lactose (HAMER, 2005), síndrome de Down (GALE et al., 1997; NISHIHARA et al., 2005) e doenças crônicas do fígado, especialmente a cirrose biliar primária (DICKY; McMILLAN, 1998). Doenças de pele em indivíduos com DC são comuns, sendo a mais importante a dermatite herpetiforme (HAMER, 2005), que é considerada como a manifestação cutânea da intolerância intestinal ao glúten (ELLIOT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

Diversas condições ginecológicas podem estar associadas à DC. Menarca tardia, menopausa precoce, amenorréia e infertilidade ocorrem com freqüência em mulheres celíacas. Além disso, estudos mostram que o número de abortos espontâneos é maior em pacientes com DC do que em mulheres sadias (KOTZE, 2004). No entanto, não há relatos de associação da concentração sérica de MBL e aborto na DC.

3.4.4 Diagnóstico

Problemas relacionados ao trato gastrointestinal podem ter uma grande variedade de causas, o que dificulta o diagnóstico da DC. Além da gravidade da doença variar significativamente, apenas o achatamento das vilosidades intestinais não é característica da doença (CICLITIRA; MOODIE, 2003). Atualmente, a associação de dados clínicos, histológicos e sorológicos confere o diagnóstico da DC (KOTZE, 2003; BAI et al., 2005). O diagnóstico definitivo se dá pela demonstração das lesões características da mucosa intestinal (HAMER, 2005). O caráter invasivo desse procedimento tem ressaltado o valor dos testes sorológicos.

A anormalidade patológica clássica no intestino delgado consiste em atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas e aumento do número de linfócitos intra-epiteliais (LIE). Estes linfócitos exibem figuras mitóticas que podem se transformar rapidamente, distinguindo a mucosa achatada na DC de outras causas de atrofia de mucosa (MARSH, 1982). A atrofia da vilosidade e linfocitose intra-epitelial não são características exclusivas da DC. Outras causas de enteropatias podem levar aos achados como gastroenterite infecciosa, proliferação bacteriana, intolerância à lactose, giardíase, anorexia nervosa, enterite isquêmica, tuberculose, doença de Crohn, hipogamaglobulinemia, esprue tropical, doença de Whipple, esprue colagenoso, enteropatia auto-imune, intolerância à proteína da soja, síndrome de Zollinger-Ellison e linfoma intestinal, além de outros estados de imunodeficiências que devem ser lembrados em casos que não parecem ser típicos de DC ou não respondem como o esperado em dieta isenta de glúten (DEWAR; CICLITIRA, 2005). Porém, o número de LIE nessas doenças não se apresenta tão aumentado como na DC (KOTZE, 1988).

A classificação da lesão celíaca proposta por MARSH (1992) divide a progressão das anormalidades da mucosa intestinal em quatro estágios distintos: lesão de Marsh tipo I (infiltrativa), tipo II (hiperplástica), tipo III (A, B e C) (destrutiva) e a lesão de Marsh do tipo IV (hipoplástica). No Brasil, em alguns centros, seguem-se correntemente, os padrões descritos por BARBIERI et al. (1970), por apresentar aspectos histológicos de maior praticidade para a interpretação. Os autores identificaram cinco padrões histológicos principais. O padrão I corresponde à morfologia normal, com vilosidades altas e cilíndricas

presentes em toda a extensão dos cortes. O padrão II corresponde a uma enteropatia inflamatória difusa. As vilosidades estão presentes, porém podem se mostrar reduzidas em altura, além do nítido aumento da celularidade linfoplasmocitária na lâmina própria. O padrão III é caracterizado pela presença de vilosidades em grupamentos reduzidos intercalados com áreas de atrofia total. A típica mucosa plana, com ausência ou leves traços de vilosidades e criptas em toda a extensão, caracteriza o padrão IV ou atrófico, revelando o máximo grau de involução da mucosa. A presença de diferentes padrões histológicos distribuídos na mucosa caracteriza o padrão V ou misto.

A maioria dos pacientes com DC produz anticorpos contra proteínas do glúten e auto-anticorpos contra reticulina, predominantemente da classe IgA. Embora não sejam centrais na patologia, representam úteis marcadores sorológicos para o diagnóstico (ELLIOT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998). Os testes sorológicos possuem um papel importante na monitoração da dieta em pacientes com DC e oferecem maior chance de se estabelecer o diagnóstico da doença. Os testes mais utilizados atualmente são a pesquisa de anticorpos anti-gliadina (AGA IgA, AGA IgG), anticorpos antiendomísio (EmA-IgA), anticorpos anti-transglutaminase tecidual (anti-tTG IgA), aliados à pesquisa de IgA total. Os EmA-IgA apresentam especificidade próxima a 100% para o diagnóstico da DC, sendo que os títulos desses anticorpos estão relacionados com o grau de atrofia das vilosidades (KOTZE et al., 2003) e com a apresentação dos sintomas (TURSI et al., 2001b). A pesquisa de EmA-IgA, juntamente com o anti-tTG, representam os testes sorológicos de escolha para o diagnóstico da DC na atualidade, pela alta sensibilidade e especificidade de ambos (KOTZE et al., 2003).

A deficiência seletiva de IgA em pacientes com DC mostra-se com padrão 16 vezes maior do que na população em geral (CATALDO et al., 1998). Indivíduos com DC e deficiência de IgA apresentam resultados falsos negativos nos testes sorológicos para a doença. Nesses, a pesquisa de IgA total deve ser realizada, além da pesquisa de AGA IgG, EmA-IgG e anti-tTG IgG (CATALDO et al., 2000). A combinação de teste positivo para IgG e deficiência de IgA sugere a execução de biópsia

Discute-se se uma bateria positiva de marcadores sorológicos pode eventualmente suprir a necessidade da biópsia intestinal (PACHT et al., 1995).

Porém, por haver uma falha no consenso internacional na interpretação desses testes, devido a variações na sensibilidade e especificidade dos mesmos (MAcMILLAN, et al., 1991; FERREIRA et al., 1992), a biópsia intestinal permaneceu por muito tempo como “gold standard” no diagnóstico da doença. Atualmente, a associação da biópsia intestinal aos testes sorológicos é que é considerada o “gold standard” para a DC (BAI et al., 2005).

3.4.5 Aspectos genéticos da DC

O desenvolvimento da DC se dá pela interação entre fatores imunológicos, ambientais (exposição ao glúten) e genéticos (HAMER, 2005). A alta taxa de prevalência (6-18%) entre familiares de primeiro e, em menor extensão, entre os de segundo grau, indicam uma forte influência genética na suscetibilidade ao desenvolvimento da doença.

A DC é uma afecção poligênica, associada principalmente aos haplótipos HLA de classe II DR3-DQ2 ou DR5/7-DQ2. A molécula DQ2, presente nas superfícies de células envolvidas na resposta imune, é codificada pelos alelos DQA1*0501 / DQB1*0201. A minoria dos indivíduos com DC possuem o haplótipo DR4-DQ8, codificado pelos alelos DQA1*0301 / DQB1*0302. O HLA DQ2 é expresso em mais de 90% das pessoas com DC, e embora 25 a 30% da população sadia apresentem-no, sabe-se que apenas uma pequena proporção vai desenvolver a doença. A expressão de DQ2 ou DQ8 é necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento da DC (GREEN; JABRI, 2003; HAMER, 2005).

A inclusão da tipagem de HLA para diagnóstico é importante especialmente em pacientes com resultados duvidosos de biópsias ou testes sorológicos negativos, ou ainda para pacientes em dieta isenta de glúten (KAUKINEN et al., 2002).

PENA, GARROTE E CRUSIUS (1998) ressaltam que os genes HLA de classe III codificam fatores que participam na modulação da resposta imune e que podem determinar a heterogeneidade e a evolução clínica da doença quando combinados aos genes de associação primária (HLA-DQ).

Somente uma pequena proporção de indivíduos que possuem a molécula HLA-DQ (DQA1*0501/DQB1*0201) desenvolvem DC. Esse fato, associado às diferenças nas taxas de concordância de DC entre gêmeos

monozigóticos e irmãos HLA idênticos, sugerem que outros genes não HLA e/ou fatores ambientais podem contribuir com o desenvolvimento da doença (SCHUPPAN, 2000).

A região cromossômica não-HLA mais consistentemente ligada à DC é a 5q31-33 (LIU et al., 2002) localizada no braço longo do cromossomo 5. Outras regiões de potencial suscetibilidade encontram-se no cromossoma 11q (NALUAI et al., 2001), 6p23 (ZHONG et al., 1996) e 15q26 (HOULSTON et al., 1997).

De acordo com MOLBERG, McADAM e SOLLID (2000), a DC não resulta do defeito de um único gene, e sim do efeito combinado do produto de diferentes genes funcionantes.

3.4.6 Auto-imunidade e DC

As características auto-imunes da DC são evidenciadas por inúmeros aspectos. Destacam-se a forma poligênica de herança, a associação com os antígenos HLA, a associação com outras doenças auto-imunes, as manifestações extra-intestinais, a infiltração linfocítica na mucosa intestinal, a presença de auto-anticorpos específicos e de auto-anticorpos associados a outras doenças auto-imunes, e a resposta à terapia com imunossupressores.

A alta prevalência de várias doenças auto-imunes concomitantes em indivíduos com DC representa outra característica da enteropatia. Diabetes tipo I, dermatite herpetiforme, tireoidite auto-imune, doenças do colágeno, alopecia auto-imune e hepatite auto-imune representam alguns exemplos. Alguns estudos mostram que a DC não diagnosticada ou não tratada predispõe à ocorrência de outras doenças auto-imunes (SCHUPPAN, 2000).

No Brasil, UTIYAMA et al. (2001) realizaram um amplo perfil de auto-anticorpos em pacientes celíacos e familiares, enfatizando a avaliação e o seguimento dos indivíduos sorologicamente positivos, para esclarecer a relevância clínica dos achados. Alguns auto-anticorpos, como os avaliados no estudo citado, mostram uma importante associação com determinadas doenças auto-imunes. Podem-se citar os anticorpos antimúsculo liso na hepatite crônica auto-imune do tipo I; anticorpos antimitocôndria na cirrose biliar primária; anticorpos anti-LKM na hepatite crônica auto-imune do tipo II; anticorpos anticélulas gástricas parietais na gastrite atrófica e na anemia

perniciosa; anticorpos antiperoxidase nas tireoidites auto-imunes; anticorpos anticélulas das ilhotas (ICA) no diabetes mellitus insulino-dependente; anticorpos antinucleares e anti DNA no lúpus eritematoso sistêmico, entre outros (RIZZETTO; SWANA; DONIACH, 1973; BIGAZZI; ROSE, 1984; FIKE, 1997a, 1997b).

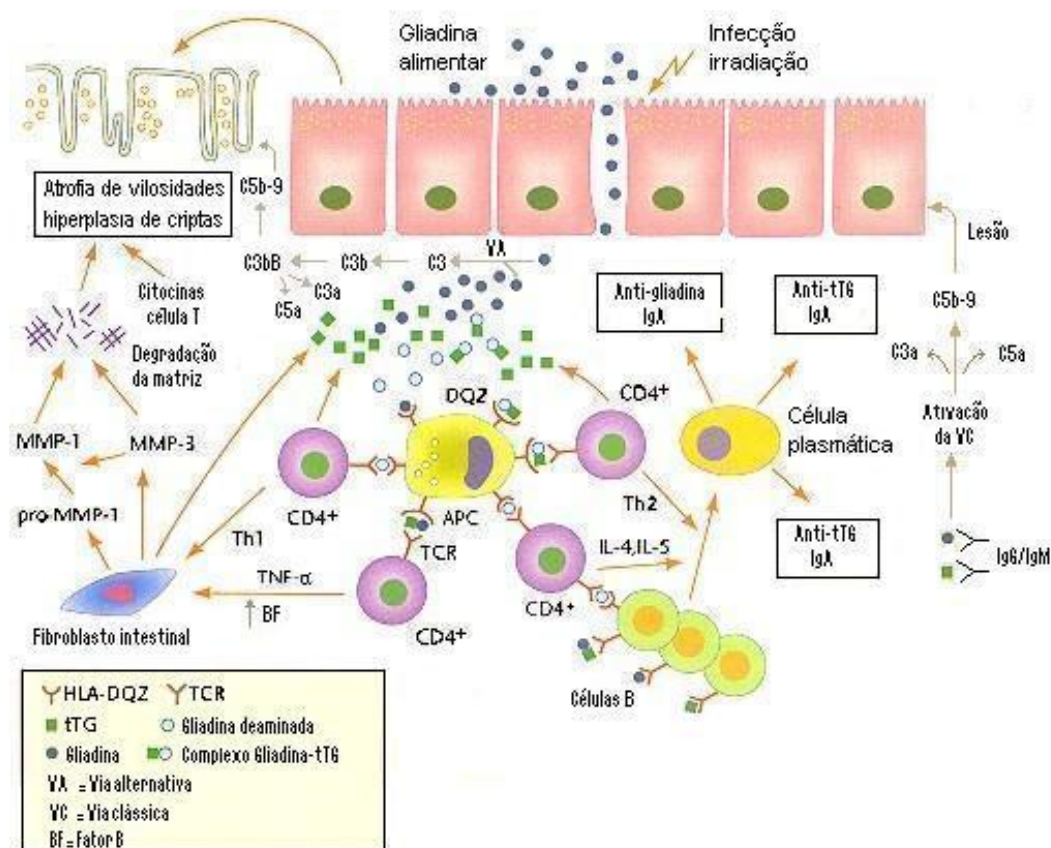
3.4.7 Imunopatogenia da DC

Sabe-se que, entre outros fatores, a resposta imunológica na DC envolve a reação de células T HLA DQ2 ou DQ8 na lâmina própria e no epitélio intestinal (GREEN; JABRI, 2003). Atualmente, considera-se que a DC esteja associada a uma resposta auto-imune altamente específica ao endomísio, estrutura da matriz extracelular. O antígeno alvo endomisial foi recentemente identificado como a transglutaminase tecidual (tTG). Essa enzima é secretada em pequenas quantidades, principalmente por células mononucleares, fibroblastos e células endoteliais que residem na matriz subepitelial do intestino (DIETERICH et al., 1997).

O processo de toxicidade ocorre inicialmente pela presença de peptídeos de glúten que atingem o epitélio intestinal (figura 3). Uma vez no epitélio, parte do glúten sofre deamidação pela transglutaminase tecidual. Após a conversão da glutamina em ácido glutâmico, os peptídeos desaminados, a gliadina ou a glutenina estão viáveis para a ligação às moléculas HLA DQ2 ou DQ8 das células apresentadoras de antígeno (HAMER, 2005).

O reconhecimento dos peptídeos pelos linfócitos CD4+, através de seus receptores (TCR), tornam possível uma resposta Th1 ou Th2, com produção de citocinas (SCHUPPAN; DIETERICH; RIECKEN, 1998). As citocinas derivadas dos linfócitos Th1, primariamente TNF- α , induzem os fibroblastos intestinais a liberarem metaloproteinases da matriz que ativam a degradação de proteínas da matriz extracelular (DAUM et al., 1999). A resposta Th2 promove a maturação de células B e expansão de plasmócitos com produção de anticorpos IgA e IgG contra a gliadina, tTG e complexos gliadina-tTG. Estas células B podem ser estimuladas, pois também podem apresentar antígenos, como peptídeos de gliadina desaminada, às células T específicas da DC (KOTZE, 2005).

FIGURA 3 – RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DC



FONTE: Adaptado de SCHUPPAN, DIETERICH e RIECKEN (1998)

A ativação das células T inicia a cascata de reações que levam ao dano do epitélio intestinal, com conseqüente alteração das vilosidades intestinais e redução da capacidade de absorção de nutrientes (HAMER, 2005).

Além do grande número de células infiltrativas presentes na lâmina própria inflamada como plasmócitos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos, pode-se isolar uma população distinta de linfócitos, as células T CD4 DQ2-restritas, que são estimuladas em presença de glúten (LUNDIN et al., 1993).

Estas células glúten-sensíveis possuem memória fenotípica, produzem interferon- α como principal citocina e causam dano ao intestino normal (NILSEN et al., 1998). Uma população de linfócitos intraepiteliais também está presente, porém sua função ainda não foi totalmente esclarecida. A maioria é CD8+ e expressa marcadores das células “natural killer” como CD94, sugerindo que podem ser citotóxicos ao enterócito (JABRI et al., 2000).

Na doença ativa, observa-se um aumento de LIE CD8+ que expressam tanto receptores $\alpha\alpha$, como $\beta\beta$. Os linfócitos T com TCR $\alpha\beta$ aumentam em resposta ao teste de ingestão de glúten e diminuem com a retirada do mesmo, enquanto os $\beta\beta$ positivos estão aumentados na DC ativa e tardia (KUTLU et al., 1993). Os LIE promovem a liberação de citocinas, como INF- γ , após a exposição ao glúten. Esta citocina estimula a expressão de moléculas HLA de classe II no epitélio intestinal e em macrófagos, favorecendo a apresentação do antígeno na mucosa (NILSEN et al., 1998).

Uma pequena porcentagem destes linfócitos são ambos CD4/CD8 negativos e expressam o receptor de célula T $\beta\beta$. Esta população de linfócitos não regride com a retirada do glúten e parece fazer parte do sistema imune inato. Parecem não requerer antígeno leucocitário humano para o reconhecimento de antígenos, reconhecem proteínas de estresse, expressas em células epiteliais, recrutando subsequente, monócitos e polimorfos (DEWAR; CICLITIRA, 2005).

Na DC não tratada, a lâmina própria sofre uma importante infiltração de plasmócitos de isotipos IgG, IgA e IgM, que produzem grandes quantidades de anticorpos. Alguns são direcionados a peptídeos do glúten e à auto-antígenos do tecido conectivo. Porém, estes anticorpos não são centrais na patogenia, uma vez que a DC clássica pode aparecer em indivíduos com deficiência seletiva de IgA (ELLIOT; MURRAY; WEINSTOCK, 1998).

3.4.8 O complemento na DC

Inúmeros estudos têm demonstrado que a ativação do sistema complemento, em resposta ao glúten alimentar na mucosa intestinal, pode representar importante papel na patogênese da DC (MOHAMMED et al., 1976; GALLAGHER et al., 1989; HALSTENSEN et al., 1992; UNSWORTH et al., 1993).

De acordo com FERGUSON, et al. (1998), o dano gerado pela ativação do complemento, através dos complexos imunes, coexiste com a resposta imune celular em pacientes celíacos não tratados e pode representar fator responsável pelas alterações na lâmina própria, pela redução na altura dos enterócitos e pela desorganização das vilosidades intestinais (figura 3). Os

antígenos envolvidos nestes complexos imunes incluem o glúten, outros alimentos e outros auto-antígenos.

Alguns estudos demonstraram diminuição na concentração sérica de C3 e C4 em pacientes celíacos, assim como produtos da ativação de C3 naqueles em dieta com glúten. Tais achados sugerem que ocorra a ativação da via clássica em consequência da resposta imune humoral ao glúten da dieta (TEISBERG et al., 1977). Corroborando estes achados, BRINCH et al. (1980), estudando o metabolismo de C3 em indivíduos adultos com DC, concluíram que a ativação do sistema complemento por complexos imunes pode ser importante fator na patogenia da doença.

Outras investigações, baseadas em técnicas de imunohistoquímica, evidenciaram, ainda, a presença de depósitos de C3 na mucosa intestinal, bem como de C5b-9 e C3 nas glândulas de Brünner do intestino de pacientes com DC, demonstrando a ativação do sistema complemento e a sua participação no processo de lesão tecidual na doença (GALLAGHER et al., 1989).

Os estudos de UNSWORTH et al. (1993) reforçam as evidências da participação do complemento na patogenia da DC, ao demonstrarem que extratos do glúten do trigo e suas subfrações são potentes ativadores da via alternativa do sistema complemento. Este fato corrobora evidências do rápido aumento da permeabilidade da mucosa intestinal após exposição ao glúten e o intenso afluxo de diferentes células inflamatórias na lâmina própria (ELLIOT, MURRAY, WEINSTOCK, 1998).

Sob o aspecto genético, embora sejam numerosas as associações entre o polimorfismo de componentes do complemento em diferentes doenças, os relatos em DC são escassos. Destacam-se estudos relacionados à variabilidade alotípica do fator B (BF), da via alternativa, em pacientes italianos (MALAVASI et al., 1980), norte-americanos (ALPER et al., 1987) e irlandeses (MANNION et al., 1993). No Brasil, os dados de UTIYAMA; KOTZE E MESSIAS (2005) sugeriram a variante BFSF como um marcador de suscetibilidade à doença e a variante BFS como marcador de proteção em familiares, embora não se tenha verificado associação com a gravidade da DC e com a presença de auto-anticorpos concomitantes.

3.4.9 A MBL e a DC

São raros os estudos de associação entre a proteína ligante de manose (MBL) e a doença celíaca. Dentre os existentes, destacam-se as abordagens de caráter genético.

Recentemente, demonstrou-se associação entre a DC e o genótipo homozigoto mutante para MBL em pacientes italianos, embora o alelo específico não tenha sido caracterizado (BONIOTTO et al., 2002). Resultados semelhantes foram descritos em pacientes finlandeses (ILTANEN et al., 2003), sugerindo que a deficiência de MBL, decorrente dos alelos mutantes, pode ter um papel na patogênese da DC.

BONIOTTO et al. (2005), relatam que a associação entre o polimorfismo gênico da MBL em pacientes italianos com DC foi mais forte na ausência de HLA DQ2 ou DQ8, que são os principais fatores de risco para a DC. Além disso, os autores demonstraram a localização simultânea de MBL e células apoptóticas nas biópsias intestinais dos pacientes, sugerindo envolvimento da proteína na remoção de corpos apoptóticos.

Neste contexto, a variação na prevalência da DC entre as populações, aliada ao aspecto poligênico da doença e ao polimorfismo da MBL, tornam pertinentes novos estudos de associação entre MBL e DC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (anexo 1) e envolveu um total de 221 indivíduos do sul do Brasil, entre pacientes e grupo controle sadio, conforme descrito a seguir.

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Pacientes

Foram estudadas amostras de soros de 101 pacientes portadores de DC, não relacionados e selecionados aleatoriamente. Todos foram diagnosticados de acordo com critérios clínicos, histológicos e sorológicos (KOTZE, 2005). As amostras já faziam parte da soroteca do Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

Todos os pacientes eram de origem caucasóide, sendo 27 (26,73%) do sexo masculino e 74 (73,27%) do sexo feminino, com faixa etária variando de 2 a 77 anos (média 37,45 anos). Dentre os 101 pacientes, 31 (30,7%) estavam em dieta isenta de glúten (pelo menos há um ano) e 70 (69,3%) em dieta habitual contendo glúten. Esse último grupo compreende indivíduos recém diagnosticados (n=55) e que transgrediam a dieta (n=15).

Os aspectos clínicos dos pacientes relativos à concomitância de outras doenças auto-imunes, presença de infecções e/ou ocorrência de abortos espontâneos, foram obtidos através dos prontuários dos pacientes.

As informações dos pacientes relativas ao número, nome, idade, sexo, classificação quanto ao uso de glúten, anticorpo antiendomísio, concentração sérica de MBL e PCR-as, grau de lesão da mucosa intestinal, presença de outros auto-anticorpos e dados clínicos, encontram-se no apêndice 1.

4.1.2 Grupo Controle

Foram estudadas amostras de soro de 120 indivíduos sadios, selecionados entre profissionais da área de saúde do Hospital de Clínicas, UFPR e de alguns laboratórios particulares da cidade, além de seus familiares, que foram pareados em relação à área geográfica, sexo, idade e origem étnica

dos pacientes. Entre os controles, 33 (27,5%) eram do sexo masculino e 87 (72,5%) do sexo feminino, com faixa etária variando de 1 a 78 anos (média 31,59 anos).

As informações do grupo controle relativas ao número, idade, sexo e concentração sérica de MBL e EmA-IgA, encontram-se no apêndice 2.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta de sangue

Após prévio esclarecimento e consentimento de todos os indivíduos incluídos nos grupos em estudo, foi coletada uma amostra de 10 ml de sangue venoso sem anticoagulante, dos pacientes e indivíduos do grupo controle. Após a centrifugação a 4°C (Centrífuga refrigerada Haraeus, Germany), as amostras de soros foram aliquotadas e armazenadas à temperatura de -80°C (Freezer GFL, Germany), até serem utilizadas nos ensaios laboratoriais.

A coleta de sangue e as determinações laboratoriais descritas a seguir foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia e de Sorologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

4.2.2 Quantificação da MBL sérica

As concentrações de MBL circulantes foram determinadas através de imunoensaio enzimático (ELISA) conforme descrito por PETERSEN et al. (2001). O valor de *cut off* do ensaio foi de 100ng/ml. Os indivíduos com valores de MBL sérica variando de 0 a 100ng/ml foram considerados deficientes. Valores variando de 101 a 1000ng/ml foram considerados médios e acima de 1000ng/ml foram considerados como altos.

O ensaio de ELISA foi realizado manualmente com placas Nunc (Maxisorb), e desenvolvido nas etapas descritas a seguir e ilustradas no esquema da Figura 4:

A adsorção prévia da placa foi realizada com 100µl de uma solução de manana (Sigma) diluída à 1:4500 em tampão de ligação (bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 9,6) à 4°C por 18 horas.

Acrescentou-se à reação 100µl de albumina humana a 1mg/ml em tampão de diluição (tris/base 20 mM; NaCl 0,1M; 0,05% de triton X; CaCl₂ 10

mM; 1 mg/ml de albumina humana, pH 7,4) e incubou-se por 1 hora à 25°C. Nesta etapa, a albumina se liga aos sítios que não adsorveram a manana, evitando reações inespecíficas nas etapas seguintes.

A seguir, através de 4 lavagens com tampão específico (tris/base 10mM; NaCl 0,14M; 0,05% *tween* 20; CaCl₂ 5 mM; 0,1% NaN₃ 0,015M, pH 7,4), removeu-se da placa todo o material em excesso. Adicionou-se às escavações 100µl dos padrões com diferentes concentrações de MBL (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) e 100µl das amostras de soro dos pacientes e controles, previamente diluídas a 1/100 com tampão de diluição. Incubou-se a placa em geladeira à 4°C por 18 horas. Nesta etapa, a MBL presente nas amostras se liga especificamente à manana adsorvida.

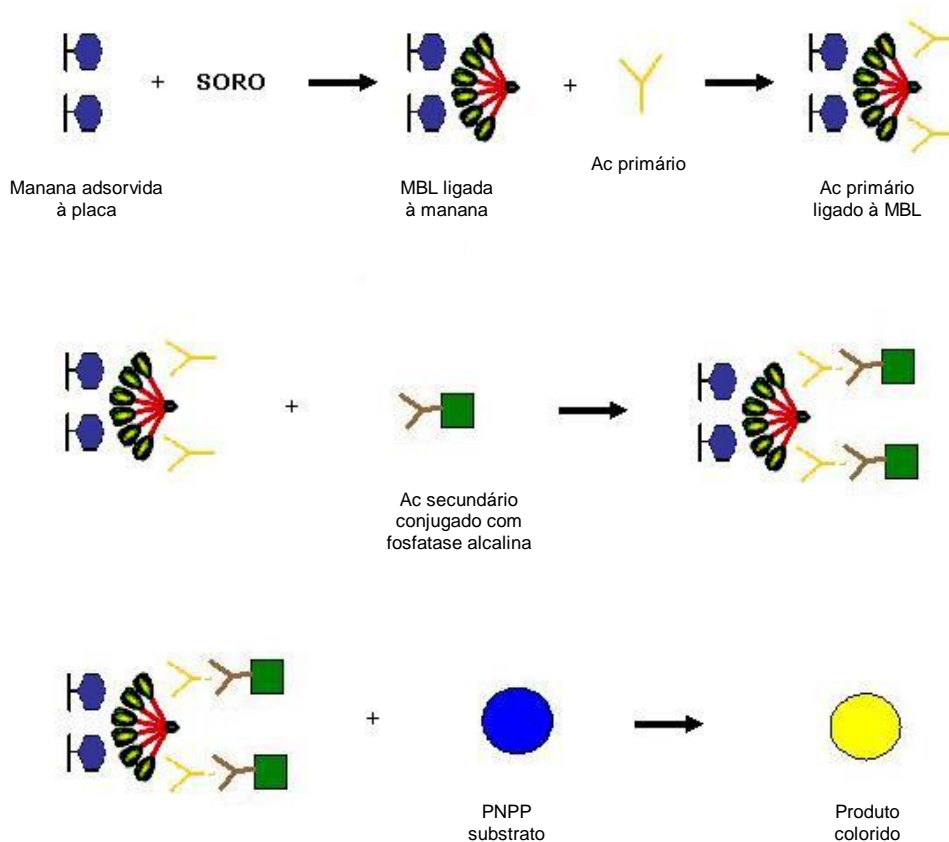
A placa foi lavada novamente por 4 vezes, com tampão de lavagem, para retirada do material que não reagiu. O anticorpo monoclonal de camundongo anti-MBL humana (Statens Serum Institute, Dinamarca), diluído a 1/1000 em tampão de diluição, foi acrescentado à reação. Procedeu-se nova incubação por 1 hora à 25°C.

Após 4 lavagens da placa com o tampão específico para a remoção dos anticorpos não ligados a MBL, adicionou-se à reação 100µl do anticorpo secundário de coelho anti-camundongo, conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, EUA), diluído à 1/2000 com tampão de diluição. Nesta etapa, o anticorpo secundário liga-se ao anticorpo primário ligado a MBL, formando um complexo. A reação ocorre em 1 hora à 25°C.

O anticorpo conjugado que não se ligou ao primário é removido por 4 lavagens com tampão específico. Na sequência, acrescentou-se o cromógeno (96ul/ml de dietanolamina, 10mg/ml de p-nitro fenol fosfato - PNPP) que atua como substrato da fosfatase alcalina. Após incubação de 18 horas à 25°C, a reação enzimática gera um produto colorido cuja intensidade de cor foi aferida em um leitor de ELISA a 450nm. A absorbância obtida das leituras dos padrões de concentrações conhecidas é proporcional à concentração de formas oligoméricas de MBL presentes nas amostras.

A presente reação foi integralmente padronizada no Laboratório de Imunopatologia do Hospital de Clínicas da UFPR.

FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REAÇÃO DE ELISA PARA MBL



FONTE: Adaptada pelo autor

NOTA: PNPP = para-nitro fenol fosfato

4.2.3 Quantificação da Proteína-C reativa de alta sensibilidade (PCR-as)

A concentração sérica de PCR-as foi medida através da técnica de Nefelometria padrão, utilizando-se kits comerciais (Dade Behring Diagnostic, Marburgh, Alemanha).

Em síntese, as amostras são diluídas automaticamente com diluente específico e são medidas em um espaço de tempo de 4 horas. As partículas de poliestireno revestidas com anticorpo monoclonal específico contra a PCR humana, formam aglutinados que dispersam a luz irradiada na presença de PCR. A intensidade da luz dispersa depende da concentração da respectiva proteína na amostra. A avaliação é feita por comparação com padrões de concentração conhecida.

As curvas de referência são obtidas por calibração de pontos múltiplos. Para a definição, são efetuadas, automaticamente, séries de diluições do padrão conhecido com o diluente.

A sensibilidade analítica da determinação é definida pelo limite inferior da curva de referência e depende, assim, da concentração da proteína no padrão utilizado. O limite de detecção para a PCR situa-se em 0,320 mg/dl para medições utilizando-se curva de calibração para processos inflamatórios. Valores superiores a 0,5mg/dl são considerados aumentados.

4.2.4 Pesquisa de anticorpos antiendomísio:

As amostras de soro do presente estudo encontravam-se previamente analisadas para a presença do EmA-IgA (KOTZE et al., 2001b; UTIYAMA, 2003) por técnica de imunofluorescência indireta, utilizando como substrato, cortes criostáticos de cordão umbilical humano, conforme descrito por LADINSER, ROSSIPAL e PITTSCHIELLER (1994). Tais dados foram analisados em relação às concentrações séricas de MBL e PCR-as.

4.2.5 Pesquisa de auto-anticorpos:

As 101 amostras dos pacientes encontravam-se previamente analisadas para a presença dos auto-anticorpos antimúsculo liso (AML), antimitocôndria (AMA), antimicrosoma de fígado e rim (LKM), antinuclear (ANA), anticélula gástrica parietal (CGP) e anti microsomal tireoideano (AAM) (UTIYAMA et al, 2001; UTIYAMA, 2003). Tais determinações foram realizadas por técnica de imunofluorescência indireta, com os substratos adequados, conforme metodologia descrita (RIZZETO; SWANA; DONIACH, 1973; BIGAZZI; ROSE, 1984).

A presença dos auto-anticorpos nas amostras de pacientes foi analisada em relação às concentrações séricas de MBL e PCR-as.

4.2.6 Avaliação histológica:

Dos 101 pacientes com DC, 88 casos foram reavaliados do ponto de vista histológico. Nos demais casos (n=13), o material não foi disponibilizado. Foram utilizadas informações da primeira biópsia, realizada por ocasião do diagnóstico. Os fragmentos foram coletados utilizando-se cápsulas de Crosby-

Kugler (College Park Instruments, MD, USA) ou com pinças usadas em endoscópios (Olympus, Japan) (KOTZE; PISANI, 1992).

A avaliação histológica foi realizada por patologista, alheio aos dados clínicos e laboratoriais dos pacientes. Foram seguidos os critérios descritos por BARBIERI et al. (1970) classificando os padrões morfológicos da mucosa jejunal desde normal (padrão I ou grau I) até atrofia total das vilosidades (padrão IV ou grau IV).

A contagem de linfócitos intra-epiteliais foi realizada de acordo com FERGUSON e MURRAY (1971).

4.2.7 Análise estatística

A análise estatística do estudo foi realizada com o auxílio do programa *Statística for Windows*, versão 99. As diferenças estatísticas entre os grupos, em relação à concentração sérica de MBL e PCR-as, foram determinadas utilizando-se o teste *Mann-Whitney*. Os resultados foram apresentados como mediana. Para a diferença entre valores encontrados e esperados foi utilizado o teste do *qui-quadrado* ou o teste Exato de Fisher, conforme adequação. O coeficiente de correlação de Pearson foi utilizado para se determinar a significância de correlação entre as variáveis (MBL e PCR-as) e para se conhecer a magnitude dessa relação. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Os resultados referentes às concentrações séricas de MBL dos pacientes e do grupo controle encontram-se nos apêndices 1 e 2, juntamente com os dados relativos ao número, nome, idade, sexo, anticorpo antiendomísio, outros auto-anticorpos, PCR-as, grau de lesão da mucosa intestinal e dados clínicos.

5.1 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL: COMPARAÇÃO ENTRE PACIENTES E CONTROLES

As concentrações séricas de MBL variaram de valores inferiores à 100ng/ml até 5.919,41ng/ml nos pacientes e até 5.314,46ng/ml nos controles. Não foi observada diferença significativa quando esses dados foram comparados (1629,6 vs 1463,15ng/ml respectivamente; $p = 0,698$), conforme representado no gráfico1.

A análise da distribuição da concentração de MBL (baixa, média e alta) entre pacientes e grupo controle não caracterizou diferença significativa (tabela 1).

5.2 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO AO SEXO

Os valores de MBL sérica obtidos diferiram significativamente quanto ao sexo dos pacientes com DC. A mediana da concentração da proteína em indivíduos do sexo masculino foi maior do que a encontrada no sexo feminino (2185,38ng/ml x 1454,61ng/ml, respectivamente; $p=0,0245$). No grupo controle, não foi observada diferença significativa entre os sexos (1467,4ng/ml para o sexo masculino x 1458,9ng/ml para o sexo feminino; $p=0,764$). Os dados estão representados no gráfico 2 e na tabela 2.

A análise da prevalência de indivíduos do sexo masculino e feminino para as faixas de concentração de MBL em estudo não caracterizou diferença significativa em pacientes e controles (tabela 2).

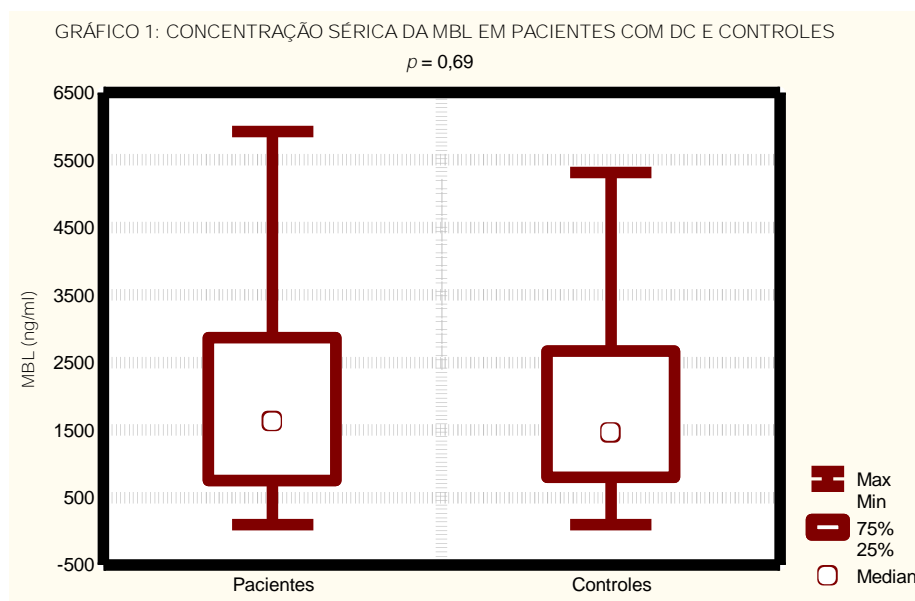


TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES E CONTROLES

MBL (ng/ml)	PACIENTES (n=101)		CONTROLES (n=120)		$p^{(1)}$
	N	%	N	%	
0-100	11	10,9	16	13,3	NS
101-1000	27	26,7	26	21,7	NS
>1000	63	62,4	78	65,0	NS
$p^{(2)}$	0,698				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significativa a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste do qui-quadrado;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

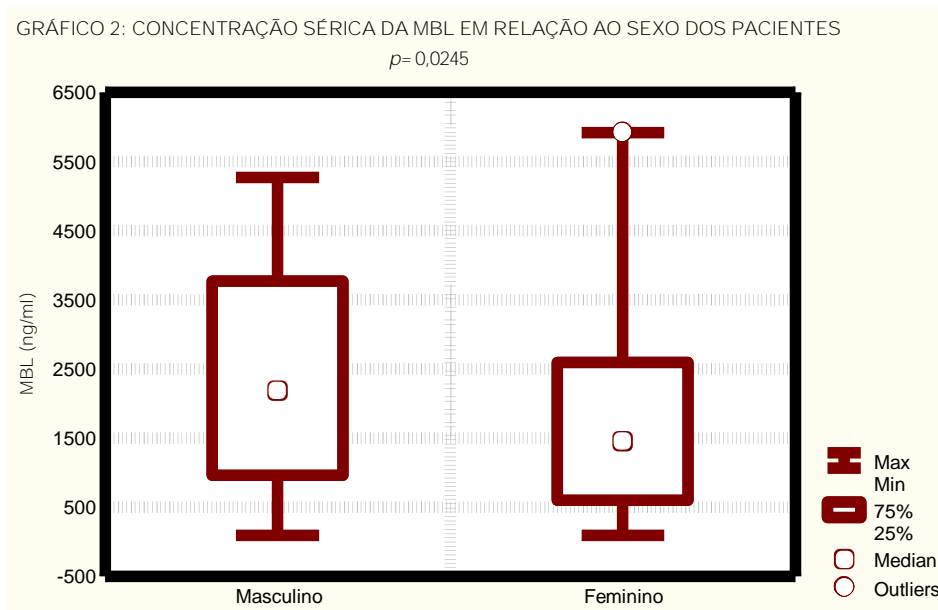


TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES E CONTROLES EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS

MBL ng/ml	MASCULINO		FEMININO		$p^{(1)}$
	N	%	N	%	
<i>PACIENTES</i>	<i>(n=27)</i>		<i>(n=74)</i>		
0-100	1	3,7	10	13,5	NS
101-1000	6	22,2	21	28,4	NS
>1000	20	74,1	43	58,1	NS
$p^{(2)}$	0,0245				
<i>CONTROLES</i>	<i>(n=33)</i>		<i>(n=87)</i>		
0-100	7	21,2	9	10,3	NS
101-1000	4	12,1	22	25,3	NS
>1000	22	66,7	56	64,4	NS
$p^{(2)}$	0,764				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significativa a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.3 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES EM RELAÇÃO À INGESTÃO DE GLÚTEN

Os valores de MBL sérica observados não diferiram significativamente quanto à presença ou ausência de glúten na dieta dos pacientes com doença celíaca. A mediana da concentração de MBL nos pacientes em dieta contendo glúten foi de 1546,9ng/ml, enquanto naqueles em dieta isenta de glúten foi de 1715,9ng/ml ($p=0,586$). De forma similar, não se observou diferença significativa quanto à presença ou ausência de glúten na dieta dos pacientes com DC, nas faixas de concentração de MBL analisadas (tabela 3).

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE GLÚTEN NA DIETA

<i>PACIENTES (n=101)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM GLÚTEN (n=70)</i>		<i>SEM GLÚTEN (n=31)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	8	11,4	3	9,7	NS
101-1000	18	25,7	9	29,0	NS
>1000	44	62,9	19	61,3	NS
<i>p⁽²⁾</i>	<i>0,586</i>				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significante a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.4 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL COM RELAÇÃO AO TÍTULO DO ANTICORPO ANTIENDOMÍSIO (EmA – IgA)

Dentre os 101 pacientes em estudo, 70 encontravam-se em dieta contendo glúten e apresentaram títulos do EmA-IgA variando de 1:2,5 à 1:80. Destes, 27,1% (n=19) apresentaram baixos títulos para EmA-IgA (1:5) e 72,9% (n=51) tinham títulos elevados (1:10).

A análise da concentração sérica da MBL não apresentou diferença significativa entre indivíduos com títulos do EmA-IgA 1:5 e 1:10, tanto em relação às medianas (1855,6ng/ml x 1462,3ng/ml, respectivamente; $p=0,460$), quanto à distribuição de indivíduos para as faixas de concentração de MBL analisadas (tabela 4).

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM RELAÇÃO AO TÍTULO DO ANTICORPO ANTIENDOMÍSIO

<i>EmA-IgA (n=70)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>EmA 1:5 (n=19)</i>		<i>EmA 1:10 (n=51)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	2	10,5	6	11,8	NS
101-1000	5	26,3	13	25,5	NS
>1000	12	63,2	32	62,7	NS
<i>p⁽²⁾</i>	<i>0,460</i>				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significante a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.5 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO AO GRAU DE LESÃO DAS BIÓPSIAS INTESTINAIS

Dos 101 pacientes com DC em estudo, 88 casos foram reavaliados do ponto de vista histológico. Desses, 5,68% (n=05) apresentaram biópsia com lesão de grau II e 94,32% (n=83) apresentaram biópsia com lesão de grau III/IV.

A mediana da concentração de MBL dos pacientes com biópsias de grau II (917,32ng/ml) não apresentou diferença significativa em relação aos pacientes cujas biópsias eram de graus III/IV (1629,6ng/ml; $p=0,412$). Com relação às diferentes faixas de concentração de MBL, não se observou diferença significativa entre os grupos. Os dados encontram-se na tabela 5. Dos 88 casos reavaliados, 33 eram de biópsias realizadas concomitantes à

coleta de soro. A análise estatística desses casos também não mostrou nenhuma diferença significativa.

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES COM BIÓPSIAS GRAU II E GRAU III / IV

<i>PACIENTES (n=88)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>GRAU II (n=05)</i>		<i>GRAU III / IV (n=83)</i>		<i>P⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	0	0	10	12,0	NS
101-1000	3	60,0	22	26,5	NS
>1000	2	40,0	51	61,5	NS
<i>p⁽²⁾</i>	<i>0,412</i>				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significativa a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.6 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO À OUTRAS DOENÇAS AUTO-IMUNES (DAI) CONCOMITANTES

Entre os pacientes em estudo, foi possível obter as informações relativas à outras doenças auto-imunes em 86 indivíduos. Desses, 26,7% (n=23) apresentavam, concomitantemente, outras DAI como dermatite herpetiforme, doenças da tireóide e diabetes mellitus.

Os valores de MBL sérica observados entre os pacientes que apresentaram ou não outras doenças auto-imunes não diferiram significativamente quando comparados entre si. A mediana da concentração de MBL nos pacientes com outras DAI concomitantes à DC foi de 971,28ng/ml, e nos pacientes que não apresentaram estas doenças foi de 1769,89ng/ml ($p = 0,245$). Tais dados encontram-se na tabela 6, assim como a análise da prevalência dos pacientes nas faixas de concentração de MBL analisadas.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES COM E SEM OUTRAS DOENÇAS AUTO-IMUNES

<i>PACIENTES (n=86)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM OUTRAS DAI (23)</i>		<i>SEM OUTRAS DAI (n=63)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	3	13,0	6	9,5	NS
101-1000	9	39,1	15	23,8	NS
>1000	11	47,9	42	66,7	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,245				

NOTA: DAI = doenças auto-imunes;

N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significante a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.7 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE OUTROS AUTO-ANTICORPOS

Foram obtidos os dados para a presença de outros auto-anticorpos nos 101 indivíduos. Desses, 12,87% (13/101) foram positivos para pelo menos um dos auto-anticorpos analisados.

Não foi possível observar diferença significativa quando se comparou o valor de MBL dos pacientes positivos para a presença de outros auto-anticorpos (728,46ng/ml) em relação aos negativos (1713,74ng/ml; $p=0,121$).

De forma similar, a análise da prevalência dos indivíduos positivos e negativos para as faixas de concentração de MBL avaliadas, não apresentou diferença significativa. Os dados encontram-se na tabela 7.

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES COM E SEM OUTROS AUTO-ANTICORPOS

PACIENTES (n=101)					
MBL (ng/ml)	Com outros auto-anticorpos (n=13)		Sem outros auto-anticorpos (n=88)		$p^{(1)}$
	N	%	N	%	
0-100	2	15,4	9	10,2	NS
101-1000	6	46,1	21	23,9	NS
>1000	5	38,5	58	65,9	NS
$p^{(2)}$	0,121				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significante a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.8 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM RELAÇÃO À OCORRÊNCIA DE ABORTO ESPONTÂNEO

Após considerar-se a idade reprodutiva e ausência de uso de algum tipo de contraceptivo, foram selecionadas 44 pacientes para análise de ocorrência de aborto espontâneo. Houve relato de abortos espontâneos em 36,36% (n=16), sendo que o número desses variou de 1 até 5.

A análise das concentrações de MBL sérica não mostrou diferença significativa entre as pacientes que apresentaram ou não aborto ($p=1,0$). A mediana da concentração de MBL nas pacientes com ocorrência de aborto foi de 1189,82ng/ml, e nas pacientes sem ocorrência de aborto foi de 1416,84ng/ml. Não se observou também diferença significativa nas faixas de concentração de MBL entre ambos os grupos de pacientes (tabela 8).

5.9 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES DO SEXO MASCULINO E FEMININO COM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS LABORATORIAIS E CLÍNICOS.

Considerando a diferença significativa observada nas concentrações séricas de MBL entre pacientes do sexo masculino e feminino, realizou-se a análise isolada em cada um desses grupos de indivíduos (apêndices 3 e 4,

respectivamente), em relação ao grau de lesão da mucosa intestinal, títulos de EmA-IgA, presença de glúten, DAI concomitantes e presença de outros auto-anticorpos. Os resultados obtidos não caracterizaram diferenças significativas tanto em relação às concentrações de MBL como às prevalências nas faixas de concentração analisadas.

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE MBL EM PACIENTES COM OCORRÊNCIA OU NÃO DE ABORTO

<i>PACIENTES (n=44)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM ABORTO (n=16)</i>		<i>SEM ABORTO (n=28)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	1	6,25	6	21,4	NS
101-1000	7	43,75	6	21,4	NS
>1000	8	50,0	16	57,2	NS
<i>p⁽²⁾</i>	<i>1,0</i>				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significante a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.10 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA PCR-as EM PACIENTES COM DC

A determinação da concentração sérica de PCR foi realizada em um grupo de 88 pacientes os quais apresentaram concentrações variando de 0,32 à 7,140mg/dl. Desses, 18 (20,5%) tiveram valores de PCR acima de 0,5mg/dl e 70 (79,5%) abaixo de 0,5mg/dl. A comparação dos valores de PCR sérica em relação ao sexo dos pacientes não caracterizou diferença significativa ($p = 0,717$) assim como a prevalência de indivíduos acima e abaixo 0,5mg/dl de PCR sérica. Esses dados estão representados na tabela 9.

TABELA 9 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PCR-as EM PACIENTES EM RELAÇÃO AO SEXO DOS INDIVÍDUOS

<i>PCR mg/dl</i>	<i>MASCULINO</i>		<i>FEMININO</i>		<i>p</i> ⁽¹⁾
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
<i>PACIENTES</i>	<i>(n=22)</i>		<i>(n=66)</i>		
<0,5	18	81,8	52	78,8	NS
>0,5	4	18,2	14	21,2	NS
<i>p</i> ⁽²⁾	0,717				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significativa a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.11 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PCR-as EM PACIENTES EM RELAÇÃO À INGESTÃO DE GLÚTEN

A mediana da concentração sérica da PCR foi a mesma (0,32mg/dl) para pacientes com e sem glúten na dieta, não representando, portanto, diferença significativa entre os grupos ($p=0,337$). A análise da prevalência de indivíduos acima e abaixo de 0,5mg/dl também não apresentou diferença significativa (tabela 10).

TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PCR-as EM PACIENTES COM RELAÇÃO À PRESENÇA DE GLÚTEN NA DIETA

TOTAL (n=88)					
PCR mg/dl	COM GLÚTEN (n=58)		SEM GLÚTEN (n=30)		p ⁽¹⁾
	N	%	N	%	
<0,5	46	79,3	24	80,0	NS
>0,5	12	20,7	6	20,0	NS
p ⁽²⁾	0,337				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significativa a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste do qui-quadrado;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

5.12 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PCR-as EM PACIENTES EM RELAÇÃO À DADOS CLÍNICOS E SOROLÓGICOS

Dentre os 88 pacientes avaliados para a PCR-as, foram analisados os aspectos dos títulos do EmA-IgA, presença de auto-anticorpos, ocorrência de outras DAI e abortos espontâneos (tabela 11).

TABELA 11 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PCR-as EM PACIENTES COM RELAÇÃO A DADOS CLÍNICOS E SOROLÓGICOS

EmA-IgA (n=58)					
PCR mg/dl	1:5 (n=17)		1:10 (n=41)		p ⁽¹⁾
	N	%	N	%	
<0,5	13	76,5	33	80,5	NS
>0,5	4	23,5	8	19,5	NS
p ⁽²⁾	0,811				
AUTO-ANTICORPOS (n=88)					
PCR mg/dl	COM (n=12)		SEM (n=76)		p ⁽¹⁾
	N	%	N	%	
<0,5	10	83,3	60	79,0	NS
>0,5	2	16,7	16	21,0	NS
p ⁽²⁾	0,584				
DAI (n=75)					
PCR mg/dl	COM (n=22)		SEM (n=53)		p ⁽¹⁾
	N	%	N	%	
<0,5	15	68,2	44	83,0	NS
>0,5	7	31,8	9	17,0	NS
p ⁽²⁾	0,078				
ABORTO (n=39)					
PCR mg/dl	COM (n=13)		SEM (n=26)		p ⁽¹⁾
	N	%	N	%	
<0,5	8	61,5	22	84,6	NS
>0,5	5	38,5	4	15,4	NS
p ⁽²⁾	0,081				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significante a nível de 0,05;

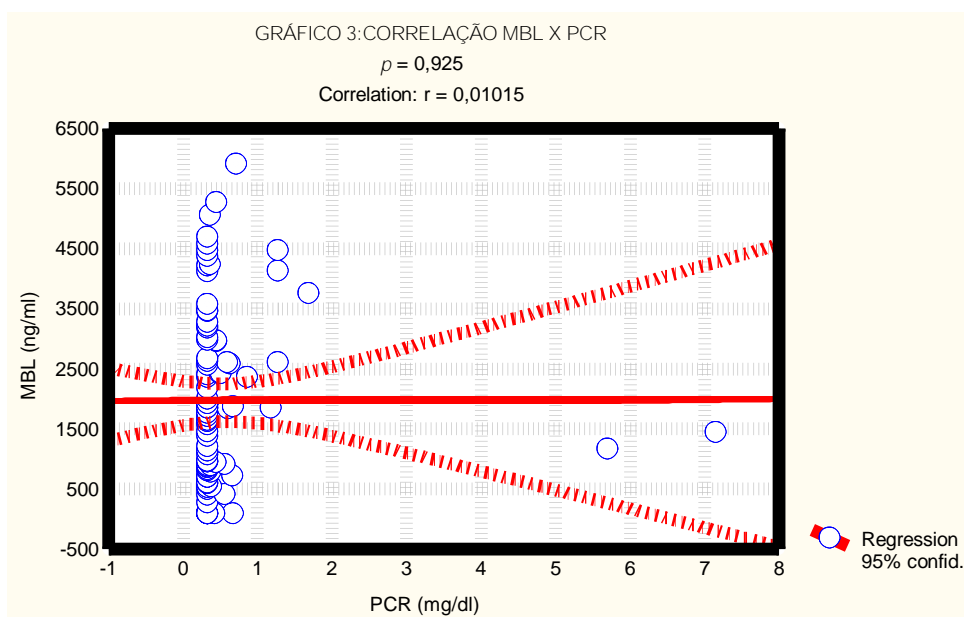
⁽¹⁾Teste do qui-quadrado / Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

A mediana da concentração sérica da PCR foi a mesma (0,32mg/dl) para pacientes com EmA-IgA 1:5 e 1:10, assim como para pacientes com e sem auto-anticorpos ($p=0,811$; $p=0,584$, respectivamente). A comparação da mediana da concentração sérica de PCR de pacientes com outras DAI (0,362mg/dl) e sem outras DAI (0,32mg/dl), assim como de pacientes com e sem aborto (0,372mg/dl; 0,320mg/dl, respectivamente), também não caracterizou diferença significativa ($p= 0,078$; $p=0,081$, respectivamente). A análise da prevalência de indivíduos acima e abaixo de 0,5mg/dl para cada um dos aspectos analisados, não apresentou diferença significativa (tabela 11).

5.13 CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL E DE PCR-as DOS PACIENTES

Os valores observados para as concentrações séricas de MBL não se correlacionaram com aqueles obtidos para PCR nas amostras dos pacientes ($r = 0,01015$; $p = 0,925$), conforme caracterizado no gráfico 3.



6 DISCUSSÃO

A MBL possui um papel complexo em diferentes afecções e influencia na gravidade de doenças infecciosas e auto-imunes, principalmente modulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TURNER, 2003).

Muitos estudos têm demonstrado a relação entre várias doenças e a MBL, tanto em relação ao genótipo quanto à concentração sérica da proteína. A fisiopatologia da maior parte das doenças auto-imunes ainda não se encontra completamente esclarecida. Sabe-se que o sistema complemento exerce importante papel no processo inflamatório de muitas dessas doenças o que vem estimulando de forma crescente os estudos de associação entre essas afecções e a MBL.

A concentração sérica da MBL varia consideravelmente entre indivíduos, decorrente da influência de mutações no gene *MBL 2* (SEIBOLD, 2004). Vários estudos têm sido realizados baseados apenas na avaliação dos genótipos de MBL. No entanto, dados recentes mostram que indivíduos com genótipos idênticos para todas as variantes conhecidas de MBL podem diferir em até 10 vezes na concentração sérica da proteína (STEFFENSEN et al., 2000).

O genótipo certamente é um bom preditor da concentração da MBL circulante, porém não permite prognosticar exatamente a concentração plasmática da proteína nos diferentes indivíduos. Exemplificando, 90% dos indivíduos que são homozigotos para o alelo selvagem (A) apresentam concentração de MBL superior a 600ng/ml, podendo atingir valores acima de 6.000ng/ml, enquanto aproximadamente 85% dos indivíduos heterozigotos (A/O) apresentam MBL inferior a 600ng/ml (MADSEN et al., 1994). Aqueles homozigotos para os alelos estruturais mutantes sempre apresentam pouca MBL detectável por ELISA, enquanto genótipos com duas cópias do haplótipo LXPA apresentam freqüentemente concentrações baixas. Na maioria dos genótipos, entretanto, tem-se uma grande variação na concentração, cabendo ainda ressaltar que podem ser encontradas concentrações muito baixas não explicadas pelo genótipo (CROSDALE et al., 2000). Tal variação pode estar relacionada tanto ao genótipo de MBL como à diferença na atividade da doença em análise particularmente. Estudos de associação permitem evidenciar como as concentrações plasmáticas da proteína podem influenciar no curso clínico da doença.

Na atualidade, a determinação da concentração sérica da MBL é realizada principalmente por técnica de ELISA. Até o momento, os estudos envolvendo DC e MBL enfocam exclusivamente aspectos genéticos e histológicos nessa relação (BONIOTTO et al., 2002; ILTANEN et al., 2003; BONIOTTO et al., 2003; 2005).

6.1 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE MBL EM PACIENTES COM DC E POPULAÇÃO SADIA

No presente estudo, a análise da concentração sérica da MBL, determinada em 101 pacientes do sul do Brasil com DC, revelou uma variação desde valores inferiores a 100ng/ml até 5.919,41ng/ml. No entanto, a comparação com os dados de 120 indivíduos sadios, com concentrações de MBL que atingiram até 5.314,46ng/ml, não permitiu observar diferença significativa entre os dois grupos, verificando-se valores de mediana muito próximos entre ambos (1.629,6ng/ml e 1.463,15ng/ml, respectivamente; $p=0,698$).

BONIOTTO et al. (2002) foram pioneiros em sugerir o envolvimento da MBL na fisiopatogenia da DC, ao caracterizarem aumento significativo na freqüência de alelos homozigotos mutantes (0/0) em pacientes italianos com DC em relação aos controles (13% vs 5%; $p=0,040$). Embora esses achados sugiram um possível predomínio de indivíduos celíacos com concentrações séricas reduzidas de MBL em relação a indivíduos sadios, o que seria bastante pertinente em uma doença de caráter auto-imune como a DC, os achados do presente estudo não corroboraram tal relação. A análise da distribuição das concentrações de MBL (baixa, média e alta) nesses pacientes foi similar ao grupo controle do estudo. Embora a prevalência de pacientes deficientes de MBL no presente estudo (10,9%) seja compatível com os achados de BONIOTTO et al. (2002) para os alelos mutantes em pacientes celíacos italianos (13%), observa-se maior freqüência de indivíduos sadios com deficiência de MBL no sul do Brasil (13,3%).

Cabe ressaltar que a concentração de MBL na população controle deste estudo não diferiu daquela já caracterizada para outros indivíduos sadios dessa mesma área geográfica, em estudos de associação de MBL com outras doenças. SHAFRANSKI et al. (2004) detectou 17,1% de deficiência protéica de

MBL, enquanto ZEN (2005) detectou 10,5% de genótipos homozigotos mutantes nos controles sadios. Análises com outras populações têm revelado uma variação de 10,8 a 16% de deficiência de MBL em indivíduos sadios de países como Dinamarca e Turquia, (CHRISTIANSEN et al., 1999; INANC et al., 2005). É possível que fatores genéticos e ambientais estejam amplamente envolvidos nas diferenças de genótipos e concentrações séricas de MBL nas diferentes populações.

Neste contexto, os dados obtidos sugerem que a concentração sérica da MBL não está associada à DC na população em estudo. A ausência de relatos similares em pacientes com DC de outras populações impossibilita análises comparativas, embora outras doenças inflamatórias intestinais já têm sido alvo de investigações.

De acordo com SEIBOLD et al. (2004), o desequilíbrio do sistema imunológico possui importante papel na patogenia de diversas doenças inflamatórias intestinais, o que também inclui a participação da MBL. A doença de Crohn e a colite ulcerativa apresentam aspectos complexos e envolvem tanto fatores genéticos como ambientais na sua patogenia. RECTOR et al. (2001) demonstraram maior frequência de variantes genéticas de MBL em indivíduos com doença de Crohn do que com colite ulcerativa. Os autores sugerem que as mutações no gene da MBL, com conseqüente decréscimo da MBL funcional circulante, poderiam proteger contra o desenvolvimento clínico da colite ulcerativa, mas não da doença de Crohn. Sugerem também, que a proteína poderia funcionar como um elo entre fatores microbianos, genéticos e imunológicos em doenças inflamatórias intestinais, uma vez que as mutações no gene *MBL-2* poderiam levar à suscetibilidade aos supostos agentes etiológicos microbianos e minimizar o dano de mucosa nessas doenças.

Outros estudos têm demonstrado ainda que os níveis relevantes de MBL que podem acarretar manifestações clínicas diferem entre as doenças. Investigações em pacientes com leucemia, por exemplo, sugerem um *cutt-off* de 500ng/ml (PETERSLUND et al., 2001) ou mesmo 1000ng/ml (NETH et al., 2001). TAKAHASHI et al. (2005) determinaram o polimorfismo do gene da *MBL-2* (códon 54) e a concentração sérica da proteína em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, visando relacionar os achados tanto com a ocorrência do LES como com a atividade e progressão da doença. Embora a frequência

de indivíduos homozigotos para o alelo 54 tenha sido significativamente maior que no grupo controle ($p = 0,02$), esse não teve associação significativa com as características da doença ou fenótipos imunológicos. A concentração sérica da MBL oscilou durante o curso do LES, mostrando relação discreta, porém significativa, com os níveis de C3 e CH50.

LOCHT et al. (2003) demonstraram que a concentração sérica da MBL de pacientes com artrite reativa não foi diferente dos controles, embora a doença esteja na interface da infecção e artrite. Os autores sugerem que o início e o curso da doença, bem como a atuação de bactérias como gatilho, não estão associados em particular com os níveis de MBL.

Embora em diabetes tipo I caracterizaram-se freqüências dos genótipos para baixa e alta expressão de MBL sérica semelhantes entre pacientes e controles sadios, as concentrações circulantes de MBL associaram-se com nefropatia e normoalbuminúria e com complicações microvasculares (HANSEN et al., 2004; HOVIND et al., 2005).

Ainda, o presente estudo evidenciou concentração significativamente maior de MBL em pacientes do sexo masculino quando comparados com pacientes do sexo feminino. Considerando que a DC acomete mais mulheres do que homens, em uma proporção aproximada de 2:1, os dados encontrados poderiam sugerir que baixas concentrações de MBL pudessem estar relacionadas a uma maior susceptibilidade das mulheres à doença. De fato, observou-se que 13,5% das pacientes apresentaram deficiência de MBL, em relação a 3,70% dos homens, embora sem atingir significância estatística.

Em pacientes com doença de Behcet, demonstrou-se maior freqüência de doenças vasculares em homens com níveis séricos de MBL bastante reduzidos ($p = 0,042$). Esses dados sugerem que a deficiência de MBL pode contribuir na patogenia e afetar o curso clínico da doença (INANC, 2005).

6.2 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL E GRAVIDADE DA DC

Nas doenças intestinais, os antígenos alimentares podem tanto afetar diretamente o sistema imunológico da mucosa como modular a flora intestinal que, por sua vez, pode influenciar a resposta imunológica (SEIBOLD, 2005).

Sabe-se que a DC é deflagrada pelo glúten, porém não se sabe exatamente qual é o evento inicial na patogênese da DC. Alguns dados

sugerem um aumento da permeabilidade intestinal, o que permite a entrada da gliadina na mucosa e submucosa (SEIBOLD, 2005).

Sabe-se que o glúten influencia na ativação do complemento (GALLAGHER, 1989; UNSWORTH, 1993) e por conseqüência, na concentração sérica das proteínas desse sistema. No entanto, neste estudo a concentração sérica de MBL foi similar entre os pacientes com ou sem glúten na dieta.

A presença do glúten caracteriza doença ativa e resposta imune exacerbada. Durante a fase aguda de muitas doenças, um grupo de proteínas séricas aumenta de concentração, podendo atuar como um indicador da presença e da extensão da inflamação e necrose tecidual. Muitas dessas proteínas de fase aguda, incluindo a MBL e a PCR, têm sido associadas à imunidade natural e defesa do hospedeiro (SUANKRATAY et al., 1998). No entanto, os dados aqui obtidos, mostram que o glúten não influenciou significativamente na concentração sérica de MBL nos pacientes avaliados. O aumento foi baixo e concordante com a literatura que apresenta a MBL como proteína de fase aguda de aumento modesto.

Tanto na DC ativa como na silenciosa ou latente, a determinação dos anticorpos EmA-IgA, constitui um importante recurso diagnóstico (KOTZE, 2005). Esses anticorpos, aliados aos dados da biópsia intestinal, representam com freqüência um parâmetro de avaliação da gravidade da DC (KOTZE et al., 2003; UTIYAMA; KOTZE; MESSIAS, 2005) correlacionando-se positivamente com o grau de atrofia das vilosidades e com a apresentação dos sintomas da doença (SATEGNA-GUIDETTI et al., 1993; TURSI et al., 2001b; SEIBOLD, 2005). Nesse estudo, buscou-se associar a MBL sérica com a gravidade da DC, através da avaliação do grau da lesão da biópsia intestinal. Os resultados obtidos não evidenciaram tal associação. A análise entre os títulos de EmA-IgA (1:5 ou 1:10) também não mostrou relação com a MBL sérica.

A concentração sérica da MBL, apresentou-se acima de 1000ng/ml em 61,5% dos indivíduos com lesão de graus III/IV e em 40% daqueles com lesão de grau II nas biópsias intestinais. Os dados também não diferiram significativamente para os dois grupos de pacientes avaliando as concentrações baixas e médias de MBL, o que não permitiu estabelecer uma relação entre as diferentes concentrações de MBL e o grau de lesão da

mucosa intestinal de pacientes celíacos, embora seja certa a participação do complemento na patogenia da DC. Tal dado se insere no contexto de uma doença complexa em que, possivelmente, a somatória de múltiplos fatores esteja envolvida no desenvolvimento e curso clínico da doença.

BONNIOTTO et al. (2005) observaram presença de depósitos de MBL em biópsias intestinais de pacientes com DC com os três genótipos de MBL (A/A; A/O; O/O), os quais foram associados com a presença de células apoptóticas. Os autores sugerem que a MBL possui papel importante na eliminação de células apoptóticas da mucosa intestinal dos pacientes e que o comprometimento desse processo, pela presença de pelo menos um alelo variante, pode predispor a outras doenças auto-imunes. Esse foi o primeiro relato “*in vivo*” da localização concomitante de MBL e células apoptóticas em pacientes celíacos.

Vários relatos na literatura têm evidenciado que a ativação do sistema complemento pode representar um importante papel na patogênese da DC. Redução significativa de C3 e C4 séricos, presença dos produtos de ativação de C3 e BF, depósitos de C3, C5b-9, IgM e IgA na mucosa intestinal são alguns desses achados (MOHAMMED et al., 1976; GALLAGHER et al., 1989; HALSTENSEN et al., 1992; UNSWORTH et al., 1993).

LHOTTA et al. (1999) detectaram presença de depósitos de MBL assim como de IgG, IgA, IgM, C1q, C3 e C5-b9 em diferentes glomerulonefrites. Apesar disso, não observaram diferença significativa entre os níveis séricos de MBL de controles normais e pacientes. Embora a MBL esteja presente nos glomérulos dos pacientes, não foi possível demonstrar qual a extensão da participação da via das lectinas na ativação global do complemento nessas glomerulopatias.

ENDO et al. (1998), também buscando investigar a possível relação da via das lectinas com nefropatia, avaliou 45 biópsias renais de pacientes com nefropatia por IgA e 35 casos de outras formas de glomerulonefrites, através de técnica de imunohistoquímica. A detecção de depósitos glomerulares de MBL sugeriu aos autores que a proteína contribui para o desenvolvimento da injúria glomerular em um número significativo de casos de nefropatia por IgA e que a

ativação intermitente da via das lectinas está associada à exposição repetida a antígenos, como por exemplo, microbianos.

INANC et al. (2005) demonstraram que a concentração sérica da MBL está diminuída em pacientes com doença de Behcet quando comparados com controles sadios, e que o curso mais grave da doença está associado aos indivíduos com níveis muito baixos de MBL.

6.3 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS DE AUTO-IMUNIDADE E DE ABORTOS ESPONTÂNEOS

Os inúmeros estudos com a DC ainda não esclarecem completamente se essa representa uma doença inflamatória com conseqüências auto-imunes secundárias ou uma doença primariamente auto-imune induzida por um fator externo conhecido. Sabe-se, no entanto, que as DAI como diabetes mellitus insulino-dependente, doenças da tireóide, síndrome de Sjögren, doença de Addison, doenças auto-imunes do fígado, cardiomiopatia e doenças neurológicas ocorrem com uma freqüência até dez vezes maior em pacientes adultos com DC, do que na população em geral (BAI et al., 2005).

A concentração sérica da MBL entre os pacientes celíacos com (n=23) e sem outras DAI (n=63) não diferiu significativamente embora se observou uma diminuição acentuada na concentração de MBL nos pacientes com outras DAI (971,28ng/ml vs 1769,89ng/ml). Dentre os 23 pacientes com outras DAI, 82,6% eram do sexo feminino. Tal aspecto corrobora com a maior prevalência da DC e de outras DAI em mulheres, assim como com a significativa diminuição nas concentrações de MBL observada nas pacientes em estudo sugerindo que valores séricos baixos de MBL podem predispor ao desenvolvimento de DAI nas mesmas.

Alelos mutantes de MBL resultam na má formação da proteína, afetando diretamente sua concentração sérica e funções, tais como a remoção de células apoptóticas e de complexos imunes. De acordo com BONIOTTO et al. (2005), defeitos na remoção de células apoptóticas associados às baixas concentrações de MBL podem levar a uma maior exposição de antígenos próprios e acúmulo de elementos potencialmente antigênicos, predispondo ao aparecimento de doenças auto-imunes e agravamento de doenças inflamatórias como a DC.

No entanto, a frequência de outras DAI nos pacientes com deficiência de MBL (13,0%) na população em estudo não permitiu estabelecer tal relação, considerando não ter diferido significativamente daquela observada nos pacientes com ausência de outras DAI (9,5%).

Dentre os 3 pacientes com duas DAI concomitantes à DC, um apresentou deficiência de MBL e 2 outros apresentaram concentrações acima de 1000ng/ml. Dentre os pacientes com hipotireoidismo, 37,5% apresentam altos níveis de MBL assim como 57% daqueles com dermatite herpetiforme. Dos três pacientes com diabetes mellitus, todos apresentaram altas concentrações da proteína (> 1000ng/ml).

Neste contexto, HANSEN et al. (2004), analisando indivíduos com diabetes tipo I, caracterizaram que as frequências dos genótipos para baixa e alta expressão de MBL sérica foi semelhante entre pacientes e controles sadios, porém o genótipo para altas concentrações de MBL era mais frequente em pacientes com nefropatia do que naqueles com normoalbuminúria, o que se confirmou na análise da concentração sérica de MBL. Os autores sugerem que a MBL pode estar envolvida na patogenia das complicações micro e macrovasculares no diabetes.

Corroborando com estes achados, HOVIND et al. (2005), estudando 270 pacientes com diabetes do tipo I, observaram que altos níveis de MBL no início do diabetes e após o desenvolvimento de complicações microvasculares estão associados significativamente com o desenvolvimento tardio de microalbuminúria persistente e macroalbuminúria. Os dados evidenciam que a ativação do complemento pela via das lectinas pode estar associada com a patogenia das complicações microvasculares no diabetes e que a MBL pode ter papel causal nessa situação.

Somente o seguimento dos pacientes com DC do presente estudo poderá gradualmente demonstrar se a MBL exerce alguma influência no aparecimento de outras DAI ou no agravamento das demais condições clínicas dos mesmos.

Dentre os pacientes que apresentaram outras DAI, 61% não faziam dieta isenta de glúten (14/23) sendo que 7 desses mostraram concentrações de MBL superior a 1000ng/ml. Na DC, inclusive na forma silenciosa não tratada, a exposição prolongada ao glúten pode contribuir para o desenvolvimento de

outras DAI (VITORIA et al., 1998; TOSCANO et al., 2000). Sabe-se ainda, que diversos auto-anticorpos podem preceder em anos o aparecimento de manifestações clínicas nas diferentes DAI. Um paciente do estudo que apresentou hipotireoidismo e dermatite herpetiforme concomitantes à DC foi positivo para o anticorpo anti-nuclear (título 1:80), embora não apresentasse clínica para lúpus ou outra doença do colágeno. Outro paciente, com dermatite herpetiforme, apesar de não ter gastrite atrófica foi positivo para o anticorpo anti-célula gástrica parietal, com título 1:80.

Dessa forma, concomitante a avaliação clínica dos pacientes do presente estudo para a presença de outras DAI, um amplo perfil de auto-anticorpos foi realizado nos mesmos. Doenças auto-imunes como hepatite crônica auto-imune, cirrose biliar primária, gastrite atrófica, lúpus eritematoso sistêmico e tireoidites auto-imunes, entre outras, estão diretamente associadas à auto-anticorpos específicos. A pesquisa de auto-anticorpos vem sendo crescentemente valorizada, visando diagnosticar enfermidades concomitantes.

No presente estudo, 12,87% (13/101) dos indivíduos foram positivos para a pesquisa de outros auto-anticorpos, apresentando pelo menos um daqueles analisados. Esses pacientes apresentaram a mediana da concentração sérica da MBL inferior àqueles negativos para presença de outros auto-anticorpos (728,46ng/ml x 1713,74ng/ml, respectivamente), porém sem atingir diferença significativa ($p=0,121$). Dos 13 pacientes positivos para a presença de outros auto-anticorpos, 84,61% (11/13) tinham concentrações de MBL >500ng/ml, verificando-se ainda o uso de glúten em 53,84% (7/13).

Estudos procuram ainda mostrar uma relação causa efeito direta entre infecções e o processo auto-imune na DC, com participação da MBL. Sugere-se que uma maior susceptibilidade a infecções intestinais e diarreia, associadas à deficiência de MBL, poderiam alterar o epitélio intestinal favorecendo um estímulo anormal da resposta imune a gliadina, atuando como um gatilho na cascata de eventos que levariam à doença (BONIOTTO et al., 2005; THIEL; FREDERIKSEN; JENSENIUS, 2006). No entanto, são raros os relatos que caracterizam a ocorrência de infecções em pacientes com DC (CARDEI et al., 2003), sendo que na população em estudo estas se apresentam em frequência muito baixa, sem característica de recorrências, não

tendo sido possível fazer uma análise em relação às concentrações de MBL e a presença de infecções.

Outro aspecto de grande interesse clínico e motivo de estudos recentes na DC tem sido a maior ocorrência de abortos espontâneos nas pacientes celíacas em relação às mulheres sadias (CARAMASHI et al., 2000; FOSCHI et al., 2002; KOTZE, 2005). As causas desse fato ainda são especulativas, podendo estar relacionadas a mecanismos endócrinos, genéticos e imunológicos (FARTHING et al., 1983; LUDVIGSSON; LUDVIGSSON, 2001; MARTINELLI et al., 2000). A presença do glúten na dieta também é um fator relevante, uma vez que após dieta isenta de glúten, observa-se uma diminuição no número de abortos (KOTZE, 2004). Aliado a esses aspectos, as variações na concentração sérica dos hormônios sexuais durante a gravidez, assim como a exposição materna a antígenos fetais, podem ativar a DC e também estar relacionados à maior ocorrência de abortos espontâneos nessas pacientes.

A ocorrência de abortos espontâneos têm sido associada a baixas concentrações séricas de MBL em mulheres sadias. Essa relação foi descrita inicialmente por KILPATRICK; BEVAN e LISTON (1995) e mais tarde confirmada por CHRISTIANSEN et al. (1999) em mulheres escocesas e dinamarquesas. Os autores sugerem que o aumento de abortos espontâneos em mulheres deficientes de MBL possa estar relacionado a uma resposta imune materna anormal aos antígenos trofoblásticos, assim como a uma resposta comprometida aos agentes microbianos na interface materno-fetal.

Dentre as 44 pacientes do presente estudo em idade reprodutiva e ausência de uso de algum tipo de contraceptivo, 36,36% (16/44) apresentaram relato de abortos espontâneos.

No entanto, os resultados obtidos não permitiram estabelecer relação entre a deficiência de MBL e a ocorrência de abortos em pacientes com DC. Porém, deve-se considerar o pequeno número de pacientes analisadas.

Também não foi possível estabelecer relação entre abortos espontâneos, ingestão de glúten e concentrações de MBL para a população de pacientes em estudo. Não foram encontrados relatos na literatura, tanto na DC como em outras DAI, que permitissem comparar os dados aqui abordados.

6.4 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PCR E CORRELAÇÃO COM A MBL SÉRICA

A proteína C-reativa está relacionada a um grupo limitado de ligantes incluindo fosfocolina, certos polímeros e polissacarídeos encontrados na superfície de bactérias, membranas presentes em mamíferos e tecido necrótico, além de ativar leucócitos e o sistema complemento (SZALAI et al., 1997).

Diferentemente de outros marcadores, a concentração sérica da PCR permanece estável durante longos períodos e não possui variação diurna. A concentração sérica da PCR e, mais discretamente, a da MBL, aumentam durante reações inflamatórias. Sítios de ligação para ambas tornam-se disponíveis nas áreas de inflamação e necrose, permitindo deposição concomitante e ativação do complemento (SUANKRATAY et al., 1998).

Nesse contexto, considerou-se de interesse analisar o comportamento de outra proteína de fase aguda, como a PCR, concomitante a MBL, em relação a alguns parâmetros avaliados nos pacientes com DC em estudo. A determinação da concentração sérica da PCR-as foi realizada em um grupo de 88 pacientes e variou de 0,32 a 7,140mg/dl. Dentre esses pacientes, 20,5% tiveram valores acima de 0,5mg/dl, o que é pertinente com a característica inflamatória da doença. Porém, não houve diferença significativa quando se avaliou o valor de PCR de pacientes em relação ao sexo, como havia sido detectado para MBL.

Embora em outras doenças inflamatórias, como a doença de Crohn, a PCR mostre relação com a atividade da doença, e represente um exame solicitado na prática clínica, a determinação da PCR não constitui um exame usual na DC, sendo que estudos enfocando esse aspecto também são escassos. BLANCO et al. (1985), investigando marcadores da doença ativa em 36 crianças com DC, encontraram valores normais de PCR na maioria dessas, enquanto outros marcadores, como a beta-2 microglobulina, mostraram relação com a atividade da doença.

Ainda que a presença do glúten seja fator determinante de DC ativa, essa não influenciou significativamente na concentração sérica da PCR-as dos pacientes. Apenas 20,7% dos pacientes usando glúten (12/58) apresentaram PCR sérica acima de 0,5mg/dl, o que foi similar ao observado para aqueles em

dieta isenta de glúten (20,0%; 6/30; $p=0,9394$). Em sua maioria, tanto pacientes em dieta com glúten como aqueles sem glúten na dieta tiveram valores normais de PCR, corroborando a ausência de relação causa efeito entre a presença de glúten e as concentrações de PCR, de forma similar aos dados também demonstrados para MBL.

As análises de associação da PCR com a ocorrência de outras DAI, abortos, presença de auto-anticorpos e títulos de EmA-IgA também não mostraram diferenças significantes. Observou-se ainda que as concentrações séricas de PCR não mostraram correlação com aquelas obtidas para MBL ($r=0,0159$). Os relatos já existentes voltados para DC e MBL não fazem referências a outras proteínas de fase aguda, que permitam comparações com os dados presentes.

SARAHEIMO et al. (2005), avaliando 191 pacientes com nefropatia diabética, associada com resistência à insulina e baixo grau de inflamação, também observaram ausência de correlação entre MBL e outros marcadores como PCR e IL-6, apesar da associação dessa com a taxa de glicose. Os autores verificaram que embora as concentrações de MBL se mostrassem aumentadas em pacientes com nefropatia diabética, essa não estava associada a PCR e IL-6.

Por outro lado, LOCHT et al. (2003), estudando artrite reativa, observaram que a MBL apresentou comportamento de proteína de fase aguda e teve correlação com a PCR apenas nos pacientes com concentração sérica de MBL superior a 1000 $\mu\text{g/L}$. De acordo com os autores, nos indivíduos com MBL de 0 a 1000 $\mu\text{g/L}$, provavelmente há indivíduos homo ou heterozigotos para genes mutantes da MBL ou com polimorfismo da região promotora que respondem inadequadamente a atividade inflamatória.

7 CONCLUSÕES

A análise dos dados do presente estudo levou às seguintes conclusões:

- 1) A comparação da concentração sérica da MBL entre pacientes com doença celíaca e indivíduos sadios da população não mostrou diferença significativa entre ambos, sugerindo ausência de relação da concentração da proteína e a DC no grupo de pacientes em estudo;
- 2) A diferença significativa na mediana das concentrações séricas da MBL entre pacientes do sexo masculino e feminino representou um achado que, até o momento, não permitiu estabelecer relação com os dados clínicos dos pacientes em análise;
- 3) A presença de glúten na dieta e os títulos do EmA-IgA não mostraram relação com a concentração sérica da MBL nos pacientes. A análise do grau de lesão da mucosa intestinal não mostrou associação entre a concentração da MBL e a gravidade da DC;
- 4) A concomitância de outras doenças auto-imunes nos pacientes com DC e a presença de outros auto-anticorpos no soro dos mesmos não mostrou relação com a concentração sérica da MBL;
- 5) A concentração sérica da MBL e a ocorrência de abortos espontâneos em pacientes com DC não apresentaram uma relação causa-efeito;
- 6) As concentrações séricas de PCR-as nos pacientes com DC não caracterizaram associação com o sexo dos mesmos, presença de glúten e demais parâmetros clínicos e sorológicos avaliados. A análise de correlação das concentrações séricas de PCR e MBL nos pacientes em estudo mostrou não haver uma relação entre as duas proteínas;
- 7) Embora relatos anteriores demonstrem associação de alelos mutantes para a MBL e depósitos dessa proteína na mucosa intestinal em pacientes com DC,

os dados obtidos não mostraram uma relação causa-efeito entre a concentração sérica da MBL e os aspectos da doença avaliados, para a população de pacientes em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. The complement system. In: _____. Cellular and molecular immunology. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1997. p. 313-338.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Effector mechanisms of humoral immunity. In: _____. Cellular and molecular immunology. 4. ed. Philadelphia: W.B Saunders Company, 2000. p. 316-334.

ALLAEDINI, A. et al. Ganglioside reactive antibodies in the neuropathy associated with celiac disease. *Journal of Neuroimmunology*, Amsterdam, v. 127, p. 145-148, 2002.

ALPER, C. A. et al. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with gluten-sensitive enteropathy. *The Journal of Clinical Investigation*, New Jersey, v. 79, n. 1, p. 251-256, 1987.

ANTUNES, L. J. Sistema do complemento. In: ANTUNES, L. J.; MATOS, K. T. F. *Imunologia Médica*. Rio de Janeiro: Atheneu, 1992. p. 45-51.

BAI, J. et al. Celiac Disease. *World Gastroenterology News*, New York, v. 10, n. 2, supplement: 1-8, 2005.

BARBIERI, D. et al. A biopsia peroral do intestino delgado na criança. III- Resultados globais. Classificação dos padrões histológicos. Correlação estereo-histológicas. Síndrome pós-biópsia. *Arquivos de Gastroenterologia*, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 141-149, 1970.

BARDELLA, M. T. et al. Prevalence of hypertransaminasemia in adult celiac patients and effect of gluten-free diet. *Hepatology*, Orlando, v. 22, p. 833-836, 1995.

BIGAZZI, P. E.; ROSE, N. R. Pruebas para anticuerpos contra antígenos tissulares específicos. In: ROSE, N. R.; FRIEDMAN, H. *El laboratorio en inmunología clínica*. 2. ed. Buenos Aires: Editorial Medica Pan Americana, 1984. p. 968-979.

BING, D. H.; ALPER, C. A. Complement in health and disease. In: COLVIN, R. B.; BHAN, A. K.; McCLUSKEY, R. T. *Diagnostic Immunopathology*. 2. ed. New York: Raven Press, 1995. p. 85-94.

BLANCO, A. et al. Increase serum beta2-microglobulin levels in active celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, New York, v. 4, n. 3, p. 388-392, 1985.

BONAR, A.; CHMIELA, M.; ROZALSKA, B. Level of mannose-binding lectin (MBL) in patients with tuberculosis. *Pneumonologia Polska*, Warsgawa, v. 72, p. 201-205, 2004.

BONIOTTO, M. et al. Variant mannose-binding lectin alleles are associates with celiac disease. *Immunogenetics*, New York, v. 54, n. 8, p. 596-598, 2002.

BONIOTTO, M. et al. Detection of MBL-2 gene expression in intestinal biopsies of celiac patients by in situ reverse transcription polymerase chain reaction. *European Journal of Histochemistry*, Trieste, v. 47, n. 2, p. 177-180, 2003.

BONIOTTO, M. et al. Evidence of a correlation between mannose binding lectin and celiac disease: a model for other autoimmune diseases. *Journal of Molecular Medicine*, Berlin, p. 1432-1440 (online), 2005.

BRINCH, L. et al. The metabolism of C3 in adult coeliac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Oslo, v. 15, n. 1, p. 33-38, 1980.

CARAMASHI, P. et al. Celiac disease and abortion: focusing on a possible relationship. *Recenti Progressi in Medicina*, Roma, v. 91, p. 72-75, 2000.

CARDEI, E. et al. Celiac disease associated with *Helicobacter pylori* infection. *Revista Medico Chirurgicala Societatti de Medici si Naturalisti Din Iasi*, Iasi, v. 107, n. 3, p. 633-635, 2003.

CATALDO, F. et al. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. *Gut*, London, v. 42, p. 362-365, 1998.

CATALDO, F. et al. IgG antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in celiac patients with selective IgA deficiency. *Gut*, London, v. 47, p. 366-369, 2000.

CHEN, C. B.; WALLIS, R. Stoichiometry of complexes between mannose-binding protein and its associated serine proteases. Defining functional units for complement activation. *The Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 276, n. 28, p. 25894-25902, 2001.

CHRISTIANSEN, O. B. et al. Mannan-binding lectin deficiency is associates whit unexplained recurrent miscarriage. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oslo, v. 49, n.2, p. 193-196, 1999.

CICLITIRA, P. J. ; MOODIE, S. J. Coeliac Disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 17, p. 181-195, 2003.

CROSDALE, D. J. et al. Mannose-binding lectin (MBL) genotype distributions with relation to serum levels in UK Caucasoids. *Immunogenetics*, New York, v. 27, p. 111-117, 2000.

DAUM, S. et al. Increased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. *Gut*, London, v. 44, p. 17-25, 1999.

DAVIES, E. J. et al. A dysfunctional allele of the mannose binding protein gene associates with systemic lupus erythematosus in a Spanish population. *The Journal of Rheumatology*, Toronto, v. 24, p. 485-488, 1997.

DEWAR, D. H.; CICLITIRA, P. J. Clinical features and diagnosis of celiac disease. *Gastroenterology*, New York, v. 128, p. S19-S24, 2005.

DICKEY, W. ; McMILLAN, S. A. Co-screening for primary biliary cirrhosis and coeliac disease. *Gut*, London, v. 43, p. 300, 1998.

DIETERICH, W. et al. Identification of the tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*, New York, v. 3, n. 7, p. 797-801, 1997.

DU CLOS, T. W. Function of C-reactive Protein. *Annals of Medicine*, Helsinki, v. 32, n. 4, p. 274-278, 2000.

EISEN, D. P.; MICHINTON, R. M. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases*, Chicago, v. 37, p. 1496-1505, 2003.

EMMERIK, L. C. et al. Binding of mannan-binding protein to various bacterial pathogens of meningitis. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 97, p. 411-416, 1994.

ENDO, M. et al. Glomerular deposition of mannose-binding lectin (MBL) indicates a novel mechanism of complement activation in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Berlin, v. 13, n. 8, p. 1984-1990, 1998.

ENDO, M. et al. Complement activation through the lectin pathway in patients with Henoch-Schonlein purpura nephritis. *American Journal of Kidney Disease*, Duluth, v. 35, n. 3, p. 401-407, 2000.

ELLIOT, D.E.; MURRAY, J.A.; WEINSTOCK, J.V. Inflammatory bowel and celiac disease. In: ROSE, N.R.; MACKAY, I.R. *The autoimmune diseases*. 3 ed. San Diego: Academic Press, 1998. p.477-509.

EPSTEIN, J. et al. The collectins in innate immunity. *Current opinion in Immunology*, London, v.8, n. 1, p. 29-35, 1996.

EZERKOWITZ, R. A. B. et al. A human serum mannose-binding protein inhibits in vitro infection by the human immunodeficiency virus. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 243, p. 500-507, 1989.

EZERKOWITZ, R. A. Genetic heterogeneity of mannose-binding proteins: the Jekyll and Hyde of innate immunity? *American Journal of Human Genetics*, Chicago, v. 62, p. 6-9, 1998.

FARTHING, M. J. C. et al. Male gonadal function in coeliac disease. II. Sex hormones. *Gut*, London, v. 24, p. 127-135, 1983.

FERGUSON, A.; MURRAY, D. Quantification of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut*, London, v. 12, n. 12, p. 988-994, 1971.

FERGUSON, A. et al. Heterogeneity of coeliac disease: clinical, pathological, immunological and genetic. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 895, p. 112-120, 1998.

FERREIRA, M. et al. Endomysial antibody: is the best screening test for coeliac disease? *Gut*, London, v. 33, n. 12, p. 1633-1637, 1992.

FIANE, A. E. et al. Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response alter thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Circulation*, Dallas, v. 108, p. 849-856, 2003.

FIKE, D. J. Non organ-specific autoimmune disease. In: SHEEHAN, C. *Clinical Immunology. Principles and Laboratory Diagnosis*. 2. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 283-296 (a).

FIKE, D. J. Organ-specific autoimmune disease. In: SHEEHAN, C. *Clinical Immunology. Principles and Laboratory Diagnosis*. 2. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 297-304 (b).

FOSCHI, F. et al. Celiac disease and spontaneous abortion. *Minerva Ginecologica*, Torino, v. 54, p. 151-159, 2002.

FRANK, M. M. Complement and kinin. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; PARSLOW, T. G. *Medical Immunology*. 9. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997. p. 169-181.

GABIUS, H.J. et al. The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et Biophysica Acta/General Subjects*, Amsterdam, v. 1572, p. 165-177, 2002.

GALLAGHER, R. B. et al. Complement activation within the coeliac small intestine is localised to Brunner's glands. *Gut*, London, v. 30, n. 11, p. 1568-1573, 1989.

GALE, L. et al. Down's syndrome is strongly associated with coeliac disease. *Gut*, London, v. 40, p. 492-496, 1997.

GARRED, P. et al. Dual role of mannan-binding protein in infections: another case of heterosis. *European Journal of Immunogenetics*, Oxford, v. 21, p. 125-131, 1994.

GARRED, P. et al. Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin. *The Lancet*, London, v. 349, p. 236-240, 1997.

GARRED, P. et al. Two edged role of mannose binding lectin in rheumatoid arthritis: a cross sectional study. *Journal of Rheumatology*, London, v. 27, p. 26-34, 2000.

GARRED, P. et al. Mannose-binding lectin deficiency – revisited. *Molecular Immunology*, Oxford, v. 40, n. 2-4, p. 73-84, 2003.

GHIRAN, I. et al. Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 192, p. 1797-1807, 2000.

GODKIN, A.; JEWELL, D. The pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*, New York, v. 115, n. 1, p. 206-210, 1998.

GRAUDAL, N. A. et al. The association of variant mannose-binding lectin genotypes with radiographic outcome in rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, Hagerstown, v. 43, p. 515-521, 2000.

GREEN, P. J. et al. Recognition of the major cell surface glycoconjugates of *Leishmania* parasites by the human serum mannan-binding protein. *Molecular and Biochemical Parasitology*, Amsterdam, v. 66, p. 319-328, 1994.

GREEN, P.H.R.; JABRI, B. Coeliac disease. *The Lancet*, London, v. 362, n. 2, p. 383-391, 2003.

HADJJIVASSILIOU, M. et al. Clinical, radiological, neurophysiological and neuropathological characteristics of gluten ataxia. *The Lancet*, London, v. 352, p. 1582-1585, 1993.

HALSTENSEN, T. S. et al. Association of subepithelial deposition of activated complement and immunoglobulin G and M response to gluten in coeliac disease. *Gastroenterology*, New York, v. 102, n. 3, p. 751-759, 1992.

HAMER, R.J. Coeliac disease: background and biochemical aspects. *Biotechnology Advances*, New York, v. 23, p. 401-408, 2005.

HANSEN, S.; HOLMSKOV, U. Structural aspects of collectins and receptors for collectins. *Immunobiology*, Oxford, v. 199, p. 165-189, 1998.

HANSEN, T. K. et al. Association between mannose-binding lectin and vascular complications in type 1 diabetes. *Diabetes*, Alexandria, v. 53, n. 6, p. 1570-1576, 2004.

HARTSHORN, K. L. et al. Human mannose-binding protein functions as an opsonin for influenza A viruses. *The Journal of clinical Investigation*, New Jersey, v. 91, p. 1414-1420, 1993.

HOLMSKOV, U. et al. Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunology today*, Cambridge, v. 15, p. 67-74, 1994.

HOULSTON, R. S.; FORD, D. Genetics of celiac disease. *The Quarterly Journal of Medicine*, Oxford, v. 89, n. 10, p. 737-743, 1996.

HOULSTON, R. S. et al. Linkage analysis of candidate regions for celiac disease genes. *Human Molecular Genetics*, Oxford, v. 6, n. 8, p. 1335-1339, 1997.

HOVIND, P. et al. Mannose-binding lectin as a predictor of microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes*, Alexandria, v. 64, p. 1523-1527, 2005.

HUANG, Y. F. et al. increased frequency of the mannose-binding lectin LX haplotype in Chinese systemic lupus erythematosus patients. *European Journal of Immunogenetics*, Oxford, v. 30, p. 121-124, 2003.

ILTANEN, S. et al. The association between mannan-binding lectin gene alleles and celiac disease. *The American Journal of Gastroenterology*, New York, v. 98, p. 2808-2809, 2003.

INANC, N. et al. Serum mannan-binding lectin levels are decreased in behcet's disease and associated with disease severity. *Journal of Rheumatology*, London, v. 32, n. 2, p. 287-291, 2005.

IOBST, S.T. et al. Binding of sugar ligands to Ca^{2+} dependent animal lectins. Analysis of mannose binding by site-directed mutagenesis and NMR. *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v. 169, p. 15505-15511, 1994.

IP, W. K. et al. Mannose-binding lectin and rheumatoid arthritis in southern Chinese. *Arthritis and Rheumatism*, Hagerstown, v. 43, p. 1679-1687, 2000.

JABRI, B. et al. Selective expansion of intraepithelial lymphocytes expressing the HLA-E specific natural Killer receptor CD94. *Gastroenterology*, New York, v. 118, p. 867-879, 2000.

JACK, D.L. et al. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 184, p. 1152-1162, 2001.

JAMES, K. Mechanisms of the nonspecific immune response. In: SHEEHAN, C. *Clinical Immunology. Principles and laboratory diagnosis*. 2. ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 33-53.

JANEWAY, C. A. et al. O sistema do complemento e a imunidade inata. In: _____. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 63-84.

KAUKINEN, K. et al. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *The American Journal of Gastroenterology*, New York, v. 97, p. 695-699, 2002.

KILPATRICK, D. C.; BEVAN, B. H.; LISTON, W. A. Association between mannan binding protein deficiency and recurrent miscarriage. *Molecular Human Reproduction*, v. 10, p. 2501-2505, 1995.

KING, A. L.; CICLITIRA, P. L. Celiac disease: strongly heritable, oligogenic, but genetically complex. *Molecular Genetics and Metabolism*, Orlando, v. 71, n. 1-2, p. 70-75, 2000.

KLICKSTEIN, L. B. et al. Complement receptor type 1 (CR1, CD35) is a receptor for C1q. *Immunity*, Cambridge, v. 7, p. 345-355, 1997.

KOTZE, L. M. S. Padrões histológicos e linfócitos intra-epiteliais da mucosa do intestino delgado nas diarreias crônicas: Curitiba, 1988. 170f. Dissertação (Mestrado de Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

KOTZE, L. M. S.; PISANI, J. C. Endoscopia e biópsia per oral do intestino delgado. In: _____. Diarreias crônicas. Diagnóstico e tratamento. 1. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p. 85-112.

KOTZE, L. M. S. Distúrbios entéricos da absorção. In: DANI, R. Gastroenterologia Essencial. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 237-250 (a).

KOTZE, L. M. S. et al. Antiendomysium antibodies in Brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives. *Arquivos de Gastroenterologia*, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 94-103, 2001(b).

KOTZE, L. M. S. et al. IgA class antiendomysial and anti-tissue transglutaminase antibodies in relation to duodenal mucosa changes in celiac disease. *Pathology*, Sydney, v. 35, n.1, p. 56-60, 2003.

KOTZE, L. M. S. Gynecologic and obstetric findings related to nutritional status and adherence to a gluten-free diet in Brazilian patients with celiac disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, New York, v. 38, p. 567-574, 2004.

KOTZE, L. M. S. Doença Celíaca. In: _____. Aparelho Digestivo Clínica e Cirurgia. 3. ed. São-Paulo: JCU Coelho (ed) Atheneu, 2005. p. 703-724.

KUTLU, T. et al. Numbers of T cell receptor (TCR) $\alpha\alpha^+$ but not $\alpha\alpha^+$ intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on long term normal diet. *Gut*, London, v. 34, p. 208-214, 1993.

LADINSER, B.; ROSSIPAL, E.; PITTSCHIELER, K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut*, London, v. 35, n. 6, p. 776-778, 1994.

LAHTEENOJA, H. et al. Oral mucosal changes in coeliac patients on a gluten-free diet. *European Journal of Oral Sciences*, v. 106, p. 899-906, 1998.

LAU, Y. L. et al. Mannose-binding protein in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, Hagerstown, v. 39, p. 706-708, 1996.

LEPORE, L. et al. Prevalence of celiac disease in patients with juvenile chronic arthritis. *Journal of Pediatrics*, St. Louis, v. 129, p. 311-313, 1996.

LHOTTA, K.; WURZNER, R.; KONING, P. Glomerular deposition of mannose-binding lectin in human glomerulonephritis. *Nephrology, Dialysis, Transplantation*, Berlin, v. 14, n. 4, p. 881-886, 1999.

LIPSCOMBE, R. J. et al. High frequencies in African and non-African populations of independent mutations in the mannose binding protein gene. *Human Molecular Genetics*, v. 1, p. 709-715, 1992.

LIU, J. et al. Genomewide linkage analysis of celiac disease in Finish families. *American Journal of Human Genetics*, Chicago, v. 70, p. 51-59, 2002.

LOCHT, H.; CHRISTIANSEN, M.; LAURSEN, L. Reactive arthritis and serum levels of mannose binding lectin – lack of association. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 131, p. 169-173, 2003.

LUDVIGSSON, J. F.; LUDVIGSSON, J. Coeliac disease in the father affects the newborn. *Gut*, London, v. 49, p. 163-175, 2001.

LUNDIN, K. E. A. et al. Gliadin-specific, HLA-DQ (α1*0501, β1*0201)restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 178, p. 187-196, 1993.

MacMILLAN, S. A. et al. Predictive value for coeliac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy. *British Medical Journal*, London, v 303, p. 1163-1165, 1991.

MADSEN, H.O. et al. A new frequent allele is the missing link in the structural polymorphism of the human mannan-binding lectin. *Immunogenetics*, New York, v. 40, p. 37-44, 1994.

MADSEN, H.O. et al. Interplay between promoter and structural gene variants control basal serum level of mannan-binding protein. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v. 155, p. 3013-3020, 1995.

MADSEN, H.O. et al. Different molecular events result in low protein levels of mannan-binding lectin in populations from southeast Africa and South America. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v. 161, p. 3169-3175, 1998.

MALAVASI, F. et al. Properdin factor B and glioxalase 1 polymorphism in celiac disease. *New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 303, n. 9, p. 530-531, 1980.

MALE, D. Migração celular e inflamação. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. 6. ed. Barueri: Manole, 2003. p. 47-64.

MANNION, A. et al. Extended major histocompatibility complex haplotypes in coeliac patients in the west of Ireland. *American Journal of Medical Genetics*, New York, v. 45, n. 3, p. 373-377, 1993.

MARSH, M. N. Studies of intestinal tissue IV. The predictive value of raised mitotic indices among jejunal epithelial lymphocytes in the diagnosis of gluten sensitive enteropathy. *Journal of Clinical Pathology*, London, v. 35, p. 517-525, 1982.

MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. *Gastroenterology*, New York, v. 102, n. 1, p. 330-354, 1992.

MARTINELLI, P. et al. Coeliac disease and unfavourable outcome of pregnancy. *Gut*, London, v. 46, p. 332-335, 2000.

MASS, J. et al. Presence of the variant mannose-binding lectin alleles associated with slower progression to AIDS. *AIDS*, Philadelphia, v. 12, p. 2275-2280, 1998.

MOHAMMED, I. et al. Multiple immune complexes and hypocomplementaemia in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *The Lancet*, London, v. 1, n. 7984, p. 487-490, 1976.

MOLBERG, O.; McADAM, S. N.; SOLLID, L. M. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Philadelphia, v. 30, n. 3, p. 232-240, 2000.

NALUAI, A. T. et al. Genome-wide linkage analysis of Scandinavian affected sib-pairs supports presence of susceptibility loci for celiac disease on chromosomes 5 e 11. *European Journal of Human Genetics*, Basel, v. 9, p. 938-944, 2001.

NETH, O. et al. Deficiency of mannose-binding lectin and burden of infection in children with malignancy: a prospective study. *The Lancet*, London, v. 358, p. 614-618, 2001.

NILSEN, E. M. et al, gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon- α in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, New York, v. 115, p. 551-563, 1998.

NISIHARA, R. M. et al. Celiac disease in children and adolescents with Down Syndrome. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, v. 81, n. 5, p. 373-376, 2005.

OGDEN, C. A. et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 194, p. 781-795, 2001.

PACHT, A. et al. The diagnostic reliability of anti-endomysial antibody in celiac disease: The north Israel experience. *Israel Journal of Medical Sciences*, Tel Aviv, v. 31, p. 218-220, 1995.

PAULLEY, L. W. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea. *British Medical Journal*, London, v. 2, n. 4, p. 1318-1321, 1954.

PENA, A. S.; GARROTE, J. A.; CRUSIUS, J. B. Advances in the immunogenetics of coeliac disease. Clues for understanding the pathogenesis and disease heterogeneity. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Oslo, v. 225, p. 56-58, 1998.

PETERSEN, S. V. et al. An assay for the mannan-binding lectin pathway of complement activation. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v. 257, n. 1-2, p. 107-116, 2001.

PETERSLUND, N. A. et al. Association between deficiency of mannose-binding lectin and severe infections after chemotherapy. *The Lancet*, London, v. 358, p. 637-638, 2001.

PETERSON, S. V.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. *Molecular Immunology*, Oxford, v. 38, p. 133-149, 2001.

PRESANIS, J. S.; KOJIMA, M.; SIM, R. B. Biochemistry and genetics of mannan-binding lectin (MBL). *Biochemical Society Transactions*, London, v. 31, p. 748-752, 2003.

PRODINGER, W. H. et al. Complement. In: PAUL, W. E. *Fundamental Immunology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999. p. 967-995.

PRODINGER, W. M. et al. Complement. In: PAUL, W. E. *Fundamental Immunology*. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams, 2003. p. 1077-1103.

RECTOR, A. et al. Mannan-binding lectin (MBL2) gene polymorphisms in ulcerative colitis and Cohn's disease. *Genes and Immunology*, v. 2, p. 323-328, 2001.

RIZZETTO, M.; SWANA, G.; DONIACH, D. Microsomal antibodies in active chronic hepatitis and other disorders. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 15, n. 3, p. 331-344, 1973.

ROSS, G. D. Complement receptors. In: ROITT, I. M.; DELVES, P. J. *Encyclopedia of Immunology*. 2. ed. London, Academic Press, 1992. p. 388-391.

ROSSI, V. et al. Substrate specificities of recombinant mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 276, p. 40880-40887, 2001.

RUGONFALVI-KISS, S. V. et al. Association of Chlamydia pneumoniae with coronary artery disease and its progression is dependent on the modifying effect of mannose-binding lectin. *Circulation*, Dallas, v. 106, p. 1071-1076, 2002.

SAEVARSDOTTIR, S. et al. Low mannose binding lectin predicts poor prognosis in patients with early rheumatoid arthritis. A prospective study. *Journal of Rheumatology*, Toronto, v. 28, p. 728-734, 2001.

SANTOS, I. K. et al. Mannan-binding lectin enhances susceptibility to visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*, Washington, v. 69, p. 5212-5215, 2001.

SATEGNA-GUIDETTI, C. et al. Serum IgA antiendomysium antibody titers as a marker of intestinal involvement and diet compliance in adult celiac sprue. *Journal of Clinical Gastroenterology*, New York, v. 17, p. 123-127, 1993.

SARAHEIMO, M. et al. Increased levels of mannan-binding lectin in type 1 diabetic patients with incipient and overt nephropathy. *Diabetologia*, Berlin, v. 48, n. 1, p. 198-202, 2005.

SCHMIEGELOW, K. P. et al. Increased frequency of mannose-binding lectin insufficiency among children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, New York, v. 100, p. 3757-3760, 2002.

SCHUPPAN, D.; DIETERICH, W.; RIECKEN, E. O. Exposing gliadin as a tasty food for lymphocytes. *Nature Medicine*, New York, v. 4, n. 6, p. 666-667, 1998.

SCHUPPAN, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*, New York, v. 119, n. 1, p. 234-242, 2000.

SEIBOLD, F. et al. Genetic variants of the mannan-binding lectin are associated with immune reactivity to mannans in Crohn's disease. *Gastroenterology*, New York, v. 127, n. 4, p. 1076-1084, 2004.

SEIBOLD, F. Food-Induced Immune Responses as Origin of Bowel Disease? *Digestion*, Basel, v. 71, p. 251-260, 2005.

SHAFRASNKI, M. D. et al. Significantly increased levels of mannose-binding lectin (MBL) in rheumatic heart disease: a beneficial role of MBL deficiency. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 138, n. 3, p. 521-525, 2004.

SHERIFF, S.; CHANG, C.Y.; EZERKOWITZ, R.A.B. Human mannose-binding protein carbohydrate recognition domain trimerizes through a triple α -helical coiled coil. *Nature Structural Biology*, v. 1, p. 789-794, 1994.

STEFFENSEN, R. et al. Detection of structural gene mutations and promoter polymorphisms in the mannan-binding lectin (MBL) gene by polymerase chain reaction with sequence-specific primers. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v. 241, p. 33-42, 2000.

SUANKRATAY, C. et al. Complement regulation in innate immunity and the acute-phase response: inhibition of mannan-binding lectin-initiated complement cytotoxicity by C-reactive protein (CRP). *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 113, p. 353-359, 1998.

SULIVAN, K. E. et al. Mannose-binding protein genetic polymorphisms in black patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, Hagerstown, v. 39, p. 2046-2051, 1996.

SUPER, M. et al. Association of low levels of mannan-binding protein with a common defect of opsonisation. *The Lancet*, London, v. II, p. 1236-1239, 1989.

SUPER, M. et al. Distinct and overlapping functions of allelic forms of human mannose binding protein. *Nature Genetics*, Boston, v. 2, n. 1, p. 50-55, 1992.

SZALAI, A. J. et al. C-reactive protein: structural biology, gene expression, and host defense function. *Immunologic Research*, Basel, v. 16, p. 127-136, 1997.

TAKAHASHI, R. et al. Association of mannose binding lectin (MBL) gene polymorphism and serum MBL concentration with characteristics and progression of systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, London, v. 64, n. 2, p. 311-314, 2005.

TEISBERG, P. et al. Complement system studies in adult coeliac disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, Oslo, v. 12, p. 873-876, 1977.

THIEL, S. et al. The concentration of C-type lectin, mannan-binding protein, in human plasma increases during the acute phase response. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 90, p. 31-35, 1992.

THIEL, S. et al. Ontogeny of human mannan-binding protein, a lectin of the innate immune system. *Pediatric Allergy Immunol*, v. 6, p. 20-23, 1995.

THIEL, S.; FREDERIKSEN, P. D.; JENSENIUS, J. C. Clinical manifestations of mannan-binding lectin deficiency. *Molecular Immunology*, v. 43, p. 86-96, 2006.

TOSCANO, V. et al. Importance of gluten in the induction of endocrine autoantibodies and organ dysfunction in adolescent celiac patients. *American Journal of Gastroenterology*, New York, v. 95, n. 7, p. 1742-1748, 2000.

TSUTSUMI, A. et al. Mannose-binding lectin gene: polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. *Genes and Immunology*, v. 2, p. 99-104, 2001.

TURNER, M. W. et al. Evaluation of C3b/C3bi opsonization and chemiluminescence with selected yeasts and bacteria using sera of different opsonic potential. *Immunology, Oxford*, v. 58, p. 111-115, 1986.

TURNER, M. W. Deficiency of mannan-binding protein – a new complement deficiency syndrome. *Clinical and Experimental Immunology, Oxford*, v. 86, n. 1, p. 53-56, 1991.

TURNER, M. W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunology Today, London*, v. 17, n. 11, p. 532-540, 1996.

TURNER, M. W.; HAMVAS, R. M. Mannose-binding lectin: structure, function, genetics, and disease associations. *Reviews in Immunogenetics*, v. 2, p. 305-322, 2000.

TURNER, M. W. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Molecular Immunology, London*, v. 40, n. 7, p. 423-429, 2003.

TURSI, A. et al. Prevalence and clinical presentation of subclinical/silent celiac disease in adults: an analysis on a 12-year observation. *Hepato-Gastroenterology, Stuttgart*, v. 48, n. 38, p. 462-464, 2001(a).

TURSI, A. et al. Low prevalence of antigliadin and antiendomysium antibodies in subclinical/silent celiac disease. *American Journal of Gastroenterology, New York*, v. 96, p. 1507-1510, 2001(b).

UNSWORTH, D. J. et al. Extracts of wheat gluten activate complement via the alternative pathway. *Clinical and Experimental Immunology, Oxford*, v. 94, n. 3, p. 539-543, 1993.

UTIYAMA, S. R. R. et al. Spectrum of autoantibodies in celiac patients and relatives. *Digestive Disease and Science, New York*, v. 46, n. 12, p. 2624-2630, 2001.

UTIYAMA, S. R. R. Variabilidade Alotípica do Fator B do Sistema Complemento em Pacientes com Doença Celíaca e Familiares. Associação com a Gravidade da Doença e a Presença de outros Auto-anticorpos. Curitiba, 2003. 174f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

UTIYAMA, S. R. R.; KOTZE, L. M. S.; MESSIAS, I. J. Complement factor B allotypes in the susceptibility and severity of coeliac disease in patients and relatives. *International Journal of Immunogenetics, Oxford*, v. 32, p. 307-314, 2005.

VILLARREAL, J. et al. Mannose binding lectin and FCgammaRIIa (CD32) polymorphism in Spanish systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology, Oxford*, v. 40, p. 1009-1012, 2001.

VITORIA, J. C. et al. Association of insulin-dependent diabetes mellitus and celiac disease: a study based on serologic markers. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 47-52, 1998.

VOLANAKIS, J. E. Human C-reactive protein: expression, structure and function. *Molecular Immunology*, Oxford, v. 38, p. 189-197, 2001.

WALPORT, M. J. Complement. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 344, n. 14, p. 1058-1066, 2001 (a).

WALPORT, M. J. Complement. *The New England Journal of Medicine*, Waltham, v. 344, n. 15, p. 1140-1144, 2001 (b).

WANG, Z. Y. et al. Polymorphism of the mannose binding lectin gene in patients with Sjogren's syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases*, London, v. 60, p. 483-486, 2001.

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure*, London, v. 2, n. 12, p. 1227-1240, 1994.

ZEN, C. H. Influência do polimorfismo gênico da lectina ligante de manose na suscetibilidade à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana e progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida. Curitiba, 2005. 107f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

ZHONG, F. et al. An autosomal screen for genes that predispose to celiac disease in the western countries of Ireland. *Nature Genetics*, New York, v. 14, n. 3, p. 329-333, 1996.

ANEXO

ANEXO 1 – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA.....	94
---	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE 1 – DADOS REFERENTES AOS PACIENTES.....	82
APÊNDICE 2 – DADOS REFERENTES AOS CONTROLES.....	86
APÊNDICE 3 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES DO SEXO MASCULINO COM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS SOROLÓGICOS E CLÍNICOS.....	89
APÊNDICE 4 – CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES DO SEXO FEMININO COM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS SOROLÓGICOS E CLÍNICOS.....	91

APÊNDICE 2 - DADOS REFERENTES AOS CONTROLES: SEXO, IDADE, TÍTULO DO ANTICORPO
ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL

N	SEXO	IDADE	EmA-IgA	MBL (ng/ml)
1	F	26	N	100
2	M	32	N	100
3	F	23	N	100
4	F	30	N	100
5	F	26	N	100
6	M	36	N	100
7	F	45	N	100
8	F	23	N	100
9	F	71	N	100
10	M	70	N	100
11	M	1a2m	N	100
12	M	19	N	100
13	M	14	N	100
14	M	37	N	100
15	F	41	N	100
16	F	55	N	100
17	F	27	N	310,56
18	M	24	N	310,56
19	F	3a6m	N	349,38
20	F	33	N	394,6
21	F	23	N	472,5
22	F	21	N	543,48
23	F	42	N	573,7
24	M	19	N	667,2
25	F	40	N	694,9
26	F	23	N	725,9
27	F	17	N	729,8
28	F	27	N	745,34
29	F	78	N	755,3
30	M	44	N	783,9
31	F	15	N	794,4
32	F	14	N	826,86
33	F	22	N	900,62
34	F	50	N	908,6
35	F	51	N	929,4
36	F	49	N	930,5
37	F	65	N	931,68
38	F	26	N	939,44
39	F	51	N	943,326
40	F	24	N	970,5
41	F	63	N	983,9
42	M	51	N	991,70
43	F	61	N	1.009,80
44	F	40	N	1.048,80
45	M	51	N	1.048,90
46	F	22	N	1.069,60
47	F	32	N	1.098,60
48	F	50	N	1.113,90
49	F	14	N	1.121,90

APÊNDICE 2 - DADOS REFERENTES AOS CONTROLES: SEXO, IDADE, TÍTULO DO ANTICORPO

ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL

N	SEXO	IDADE	EmA-IgA	MBL (ng/ml)
50	F	38	N	1.149,10
51	M	21	N	1.156,84
52	F	24	N	1.207,30
53	M	8	N	1.219,10
54	F	60	N	1.235,70
55	F	28	N	1.295,45
56	M	13	N	1.300,60
57	F	28	N	1.331,52
58	F	33	N	1.393,64
59	M	10a11m	N	1.430,40
60	F	40	N	1.458,90
61	M	25	N	1.467,40
62	F	17	N	1.588,75
63	F	41	N	1.719,73
64	F	59	N	1.747,10
65	M	54	N	1.801,60
66	F	40	N	1.832,70
67	F	39	N	1.882,77
68	M	70	N	1.918,50
69	F	51	N	1.926,30
70	M	17	N	1.954,80
71	F	56	N	1.993,70
72	M	16	N	2.022,50
73	F	24	N	2.030,30
74	F	56	N	2.058,60
75	F	42	N	2.111,80
76	M	29	N	2.111,80
77	F	28	N	2.154,60
78	F	22	N	2.237,70
79	F	36	N	2.245,50
80	F	22	N	2.255,40
81	M	16	N	2.318,20
82	F	64	N	2.359,18
83	M	20	N	2.360,30
84	F	30	N	2.388,30
85	F	37	N	2.403,90
86	F	23	N	2.474,70
87	M	8	N	2.512,90
88	F	49	N	2.544,08
89	F	6	N	2.575,20
90	M	47	N	2.639,70
91	F	22	N	2.681,60
92	F	31	N	2.736,81
93	F	26	N	2.787,27
94	F	68	N	2.806,30
95	F	34	N	2.965,80
96	F	45	N	3.045,00
97	F	23	N	3.091,80
98	F	29	N	3.214,30

APÊNDICE 2 - DADOS REFERENTES AOS CONTROLES: SEXO, IDADE, TÍTULO DO ANTICORPO
ANTIENDOMÍSIO (EmA-IgA), CONCENTRAÇÃO SÉRICA DA MBL

APÊNDICE 3 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES DO SEXO MASCULINO (N=27) COM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS SOROLÓGICOS E CLÍNICOS

<i>GLÚTEN (n=27)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM GLÚTEN (n=17)</i>		<i>SEM GLÚTEN (n=10)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	1	5,9	0	0	NS
101-1000	4	23,5	2	20,0	NS
>1000	12	70,6	8	80,0	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,651				

<i>EMA-IGA (n=17)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>EMA 1:5 (n=6)</i>		<i>EMA 1:10 (n=11)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	0	0	1	9,1	NS
101-1000	2	33,3	2	18,2	NS
>1000	4	66,7	8	72,7	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,615				

<i>BIÓPSIAS (n=22)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>GRAU II (n=2)</i>		<i>GRAU III/IV (n=20)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	0	0	1	5,0	NS
101-1000	1	50,0	4	20,0	NS
>1000	1	50,0	15	75,0	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,424				

<i>DAI (n=19)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM (n=4)</i>		<i>SEM (n=15)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	0	0	0	0	NS
101-1000	1	25,0	3	20,0	NS
>1000	3	75,0	12	80,0	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,161				

<i>AUTO-ANTICORPOS (n=27)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM (n=3)</i>		<i>SEM (n=24)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	1	33,33	0	0	NS
101-1000	1	33,33	5	20,8	NS
>1000	1	33,33	19	79,2	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,089				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significante a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste do qui-quadrado ou Teste exato de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

APÊNDICE 4 - CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE MBL EM PACIENTES DO
SEXO FEMININO (N=74) COM RELAÇÃO AOS PARÂMETROS
SOROLÓGICOS E CLÍNICOS

<i>GLÚTEN (n=74)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM GLÚTEN (n=53)</i>		<i>SEM GLÚTEN (n=31)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	7	13,2	3	14,3	NS
101-1000	14	26,4	7	33,3	NS
>1000	32	60,4	11	52,4	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,895				

<i>EMA-IGA (n=53)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>EMA 1:5 (n=13)</i>		<i>EMA 1:10 (n=40)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	2	15,4	5	12,5	NS
101-1000	3	23,1	11	27,5	NS
>1000	8	61,5	24	60,0	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,772				

<i>BIÓPSIAS (n=66)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>GRAU II (n=3)</i>		<i>GRAU III/IV (n=63)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	0	0	9	14,3	NS
101-1000	2	66,7	18	28,6	NS
>1000	1	33,3	36	57,1	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,508				

<i>DAI (n=67)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM (n=19)</i>		<i>SEM (n=48)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	3	15,8	6	12,5	NS
101-1000	8	42,1	12	25,0	NS
>1000	8	42,1	30	62,5	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,577				

<i>AUTO-ANTICORPOS (n=74)</i>					
<i>MBL (ng/ml)</i>	<i>COM (n=10)</i>		<i>SEM (n=64)</i>		<i>p⁽¹⁾</i>
	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	
0-100	1	10,0	9	14,1	NS
101-1000	5	50,0	16	25,0	NS
>1000	4	40,0	39	60,9	NS
<i>p⁽²⁾</i>	0,462				

NOTA: N = número de indivíduos nos grupos em estudo;

NS = não significante a nível de 0,05;

⁽¹⁾Teste do qui-quadrado ou Teste exato de Fisher;

⁽²⁾Teste de Mann-Whitney

N	SEXO	IDADE	EmA-IgA	MBL (ng/ml)
99	M	23	N	3.268,60
100	F	22	N	3.288,00
101	M	6	N	3.291,70
102	F	52	N	3.330,60
103	F	21	N	3.398,10
104	M	12	N	3.404,50
105	F	31	N	3.408,50
106	F	34	N	3.426,70
107	F	23	N	3.544,27
108	F	1	N	3.579,90
109	F	26	N	3.586,96
110	M	6	N	3.594,70
111	F	41	N	3.642,20
112	M	7	N	3.656,84
113	M	20	N	3.681,10
114	F	17a6m	N	3.738,20
115	F	2a11m	N	3.761,60
116	F	30	N	3.854,80
117	M	14a8m	N	4.076,10
118	F	19	N	4.088,70
119	F	24	N	4.320,60
120	F	8	N	5.314,46

NOTA: N = negativo